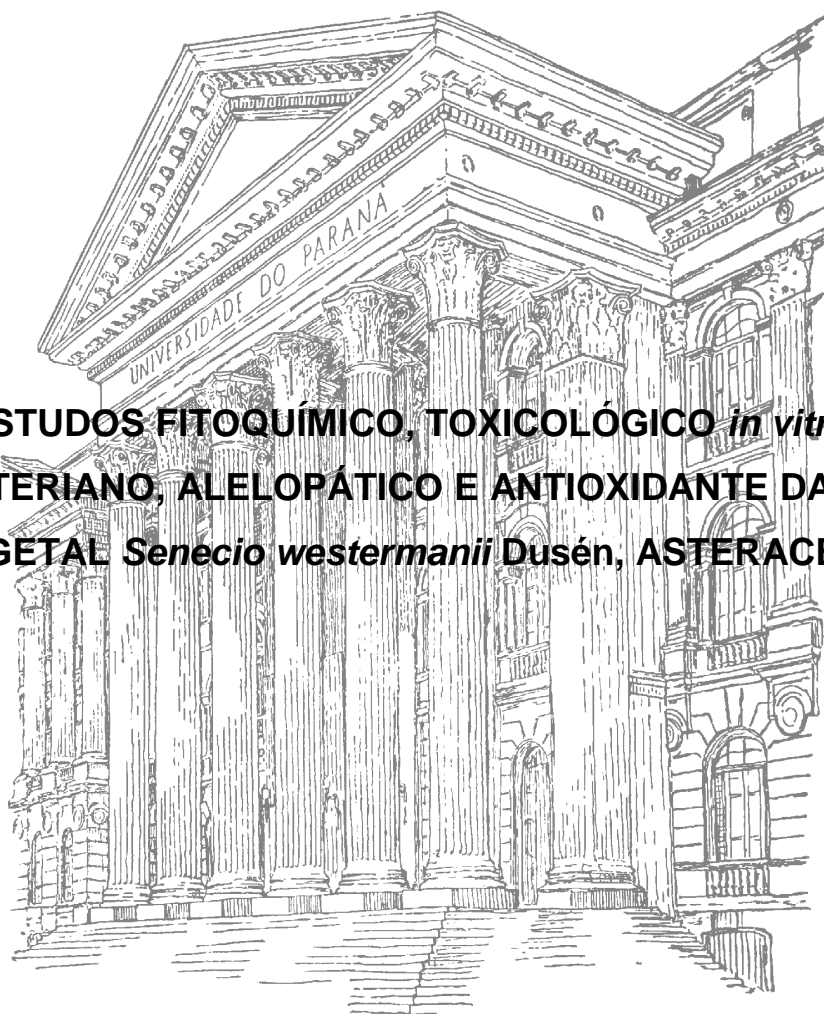


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIS JOSÉ ZORTÉA MERINO

**ESTUDOS FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO *in vitro*,
ANTIBACTERIANO, ALELOPÁTICO E ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE
VEGETAL *Senecio westermanii* Dusén, ASTERACEAE**



CURITIBA

2014

FRANCIS JOSÉ ZORTÉA MERINO

**ESTUDOS FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO *in vitro*,
ANTIBACTERIANO, ALELOPÁTICO E ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE
VEGETAL *Senecio westermanii* Dusén, ASTERACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profº Drº Obdulio Gomes Miguel

Co-orientador: Profª Drª Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus** por dar-me a chance de estar neste mundo.

À minha esposa e companheira **Ariane** e meu lindo filho **João Pedro** pela paciência e imensa força e coragem que eles transmitiram a mim.

Aos meus pais, **Dilene e Geraldo**, que me transformaram em uma pessoa digna e com grande competência para enfrentar os mais diversos desafios.

Aos meus irmãos **Denis, Régis e Vinícius** que sempre estiveram ao meu lado e apoiando-me nas minhas escolhas.

Aos meus sogros, **Ivanete e João**, por acolher a minha família e pelos conselhos de pais.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade.

Ao meu orientador **Prof Dr Obdulio Gomes Miguel** e co-orientadora **Profª Drª Marilis Dallarmi Miguel** pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

Ao **Prof Dr Roberto Pontarolo** pela oportunidade e por ceder o laboratório em algumas etapas do desenvolvimento do trabalho.

Ao **Prof Dr Railson Henneberg** e suas orientadas por ceder o espaço para o andamento da pesquisa.

Ao Biólogo **Osmar do Santos Ribas** pelas informações, identificação e depósito do exemplar da espécie em estudo.

Ao **Departamento de Química** da Universidade Federal do Paraná pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

A professora **Josiane Dias, Sandra Zanin e Vitor Kerber** por compartilhar seus conhecimentos e pelas conversas distraídas.

À **Angela Souza**, microbiologista do Hospital de Clínicas, pela realização do ensaio microbiológico.

Aos doutorandos **Fernanda Colombi Cansian, Vinícius Bednarczuk de Oliveira, Cristiane da Silva Paula, Mariana Saragioto Krause, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota, Ana Flavia Schvabe Duarte, Cristiane Bezerra da Silva** pelas sugestões e conversas construtivas.

Aos mestrandos **Marileda Zuchetto, Juliana Danna Kulik, Ellis Marina Szabo, Maislian de Oliveira, Isabel Christina e Vinícius José Bolognesi** pelo apoio e trabalho em conjunto.

Ao técnico **Paulo Sérgio Diniz** pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e amizade.

Ao secretário **Jean Godoi** pela paciência e sanar todas as nossas dúvidas.

E a todos aqueles que eventualmente não estão citados, mas que, com certeza, participaram direta ou indiretamente para a realização e término deste trabalho.

“Livros não mudam o mundo, pessoas mudam o mundo. Livros mudam pessoas.”

(Mário Quintana)

RESUMO

A espécie *Senecio westermanii* Dusén, pertencente à família Asteraceae, é encontrada nos estados do Paraná e São Paulo, na região da Floresta Atlântica. A falta de estudos sobre esta espécie motivou o desenvolvimento deste trabalho que tem como objetivo principal a avaliação dos constituintes químicos da espécie e de suas atividades biológicas. Estudos realizados com espécies do gênero *Senecio* indicam a presença de alguns compostos como alcaloides pirrolizidínicos, sesquiterpenos com esqueleto furoeremofilano, flavonoides, triterpenos, monoterpenos e sesquiterpenos. Para o estudo da espécie foi obtido o extrato bruto utilizando metanol como solvente. Em seguida, o extrato bruto foi fracionado com solventes de polaridade crescente para a obtenção das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a hidroalcoólica remanescente. As atividades biológicas avaliadas foram a alelopatia com sementes de *Lactuca sativa*, toxicidade frente à *Artemia salina*, atividade antibacteriana, atividade hemolítica e atividade antioxidante (DPPH, complexo fosfomolibdênio e TBARS). Resultados indicaram a presença do β -sitosterol, estigmasterol e campesterol na fração hexano das partes aéreas de *S. westermanii*. Nenhuma das frações e extrato bruto causou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Na atividade alelopática foi verificada a influência negativa das frações e extrato bruto frente aos ensaios de germinação, crescimento e respiração das sementes de *Lactuca sativa*. Na atividade hemolítica a fração hexano, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, causou hemólise semelhante ao controle. Na atividade antioxidante pelo método DPPH a fração acetato de etila apresentou a maior atividade, com IC_{50} de 26,98 μg ; no complexo fosfomolibdênio a fração clorofórmio apresentou atividade de 92,5% comparada ao controle rutina.

Palavras-chaves: β -sitosterol. Estigmasterol. Campesterol. *Artemia salina*.

Antioxidante. Alelopatia.

ABSTRACT

The specie *Senecio westermanii* Dusen, belonging to the Asteraceae family, is found in the states of Paraná and São Paulo in the Atlantic Forest region. The lack of studies on this species led to the development of this work has as main objective the evaluation of the chemical constituents of the species and their biological activities. Studies with species of the genus *Senecio* indicate the presence of some compounds such as pyrrolizidine alkaloids, sesquiterpenes with furoeremofilano skeleton, flavonoids, triterpenes, monoterpenes and sesquiterpenes. For the study of the species was obtained the crude extract using methanol as solvent. Then the crude extract was fractionated with solvents of increasing polarity to obtain the fractions hexane, chloroform, ethyl acetate and the remaining hydroalcoholic. The biological activities evaluated were evaluated allelopathy with seeds of *Lactuca sativa*, toxicity on *Artemia salina*, antibacterial activity, hemolytic activity and antioxidant activity (DPPH, phosphomolybdenum complex and TBARS). Results indicated the presence of β -sitosterol, stigmasterol and campesterol in hexane fraction of the aerial parts of *S. westermanii*. None of the fractions and crude extract caused toxicity against the microcrustacean *Artemia salina*. In the allelopathic activity was observed negative influence of the crude extract and fractions against testing of germination, growth and respiration of the seeds of *Lactuca sativa*. In the hemolytic activity the hexane fraction at 1000 mg/mL caused hemolysis similar to control. In the antioxidant activity by DPPH method the ethyl acetate fraction showed the highest activity, with IC_{50} of 26,98 μ g; in the phosphomolybdenum complex the chloroform fraction showed activity of 92,5 % compared to rutin control.

Keywords: β -sitosterol. Stigmasterol. Campesterol. *Artemia salina*. Antioxidant. Allelopathy.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DA FAMÍLIA ASTERACEAE NO BRASIL | 22 |
| FIGURA 2 – NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIE DA FAMÍLIA ASTERACEAE POR REGIÃO | 23 |
| FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO <i>Senecio</i> L. NO BRASIL..... | 25 |
| FIGURA 4 – NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Senecio</i> L. POR REGIÃO..... | 26 |
| FIGURA 5 – REGIÕES HABITADAS PELA ESPÉCIE <i>S. westermanii</i> DUSÉN..... | 27 |
| FIGURA 6 – FOTOGRAFIAS DA ESPÉCIE <i>SENECIO westermanii</i> DUSÉN NO LOCAL DA COLETA | 28 |
| FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>S. westermanii</i> | 29 |
| FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS EM PARTES AÉREAS DE <i>S.</i> <i>westermanii</i> DUSÉN, ASTERACEAE..... | 54 |
| FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN ¹ H DO ISOLADO FH-39 | 61 |
| FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN DEPT DO ISOLADO FH-39 | 62 |
| FIGURA 11 – ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO ISOLADO FH-39..... | 63 |
| FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DO β-SITOSTEROL | 65 |
| FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTIGMASTEROL | 65 |
| FIGURA 14 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CAMPESTEROL | 65 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> A O CONTROLE HEMÓLISE TOTAL | 69 |
| GRÁFICO 2 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> | 73 |
| GRÁFICO 3 – COMPRIMENTO DA RADÍCULA DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> COMPARADAS AO CONTROLE ÁGUA..... | 75 |
| GRÁFICO 4 – COMPRIMENTO DO HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> COMPARADAS AO CONTROLE ÁGUA..... | 75 |
| GRÁFICO 5 – COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS DO ENSAIO DE RESPIRAÇÃO DAS RAÍZES DAS SEMENTES <i>L. sativa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> COMPARADAS AO CONTROLE ÁGUA..... | 77 |
| GRÁFICO 6 – COMPARAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE TOTAL DAS PLÂNTULAS DAS SEMENTES <i>L. sativa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> COMPARADAS AO CONTROLE ÁGUA | 79 |
| GRÁFICO 7 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A VITAMINA C | 81 |
| GRÁFICO 8 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A RUTINA | 81 |
| GRÁFICO 9 – CURVA PADRÃO DA VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH..... | 82 |
| GRÁFICO 10 – CURVA PADRÃO DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH..... | 83 |
| GRÁFICO 11 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>S. westermanii</i> DO EXTRATO BRUTO PELA REDUÇÃO DO DPPH | 83 |

| | |
|---|----|
| GRÁFICO 12 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>S. westermanii</i> DA FRAÇÃO HEXANO PELA REDUÇÃO DO DPPH..... | 84 |
| GRÁFICO 13 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>S. westermanii</i> DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO PELA REDUÇÃO DO DPPH..... | 84 |
| GRÁFICO 14 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>S. westermanii</i> DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PELA REDUÇÃO DO DPPH | 85 |
| GRÁFICO 15 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>S. westermanii</i> DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE PELA REDUÇÃO DO DPPH..... | 85 |
| GRÁFICO 16 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> PELO MÉTODO TBARS COMPARADO AO BHT | 87 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – ENQUADRAMENTO DA ESPÉCIE <i>S. westermanii</i> DUSÉN | 26 |
| TABELA 2 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS | 55 |
| TABELA 3 – RESULTADOS OBTIDOS COM O EXTRATO BRUTO | 56 |
| TABELA 4 – RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO 20% | 56 |
| TABELA 5 – RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 20% | 57 |
| TABELA 6 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET | 59 |
| TABELA 7 – DESLOCAMENTO QUÍMICO NO ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO ISOLADO FH-39 | 64 |
| TABELA 8 – ENSAIO DE MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> E DL ₅₀ UTILIZANDO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> | 66 |
| TABELA 9 – ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO | 68 |
| TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> | 70 |
| TABELA 11 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI | 72 |
| TABELA 12 – ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI | 74 |
| TABELA 13 – ENSAIO DE RESPIRAÇÃO DAS RAÍZES DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI | 76 |

| | |
|---|----|
| TABELA 14 – ENSAIO DE FOTOSSÍNTESE DAS PLÂNTULAS DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>S. westermanii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI..... | 78 |
| TABELA 15 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO | 80 |
| TABELA 16 – RESULTADO DE IC ₅₀ E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH DE <i>S. westermanii</i> | 86 |
| TABELA 17 – RESULTADO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO TBARS | 87 |

LISTA DE SIGLAS

| | | |
|-------|---|---|
| ARR% | – | Atividade Antioxidante Relativa |
| ATCC | – | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BHT | – | Butilhidróxidotolueno |
| CCD | – | Cromatografia em Camada Delgada |
| CG-EM | – | Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa |
| CIM | – | Concentração Inibitória Mínima |
| CLAE | – | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DAD | – | Detector de Arranjo de Diodo |
| DMSO | – | Dimetil Sulfóxido |
| DPPH | – | 2,2-difenil-1-picrilhidrazila |
| HPLC | – | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| MDA | – | Malonaldeído |
| NBT | – | Azul <i>p</i> -Nitrotetrazólio |
| PBS | – | Salina Tamponada com Fosfato |
| PMA | – | <i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i> |
| RMN | – | Ressonância Magnética Nuclear |
| TBARS | – | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TTC | – | Cloreto de Trifenil Tetrazolium |
| UFC | – | Unidade Formadora de Colônia |
| UV | – | Ultra Violeta |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|--|
| % | – Por cento |
| > | – Maior que |
| < | – Menor que |
| µg | – Micrograma |
| µg/mL | – Micrograma por mililitro |
| µL | – Microlitro |
| °C | – Graus celsius |
| ABAP | – 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto |
| cm | – Centímetro |
| DL ₅₀ | – Dose letal média |
| g | – Grama |
| g/L | – Grama por Litro |
| H ₂ SO ₄ | – Ácido sulfúrico |
| H ₃ BO ₃ | – Ácido bórico |
| HCl | – Ácido clorídrico |
| IC ₅₀ | – Concentração inibitória média |
| mg | – Miligramas |
| mg/mL | – Miligrama por mililitro |
| MHz | – Mega Hertz |
| mL | – Mililitro |
| mm | – Milímetros |
| M | – Molar |
| N | – Normal |
| NaCl | – Cloreto de sódio |
| NaOH | – Hidróxido de sódio |
| nm | – Nanômetro |
| pH | – Potencial hidrogeniônico |
| SDS | – Dodecil sulfato de sódio |
| W | – Watt |
| v/v | – Volume/volume |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 OBJETIVOS..... | 20 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 20 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE | 21 |
| 3.2 GÊNERO <i>Senecio</i> | 24 |
| 3.3 ESPÉCIE <i>Senecio westermanii</i> DUSÉN | 26 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 MATERIAL BOTÂNICO..... | 29 |
| 4.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE | 30 |
| 4.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS..... | 31 |
| 4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR..... | 31 |
| 4.4.1 Preparo do extrato hidroalcoólico 20%..... | 32 |
| 4.4.1.1 Pesquisa de flavonoides..... | 33 |
| 4.4.1.2 Pesquisa de alcaloides..... | 35 |
| 4.4.1.3 Pesquisa de cumarinas | 35 |
| 4.4.1.4 Pesquisa de antraquinonas e naftoquinonas..... | 36 |
| 4.4.1.5 Pesquisa de esteróis e triterpenos | 37 |
| 4.4.2 Preparo do extrato aquoso 20%..... | 38 |
| 4.4.2.1 Pesquisa de antocianinas..... | 38 |
| 4.4.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos | 38 |
| 4.4.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos | 39 |
| 4.4.2.4 Pesquisa de taninos | 40 |
| 4.4.2.5 Pesquisa de amino grupos | 41 |
| 4.4.2.6 Pesquisa de ácidos fixos | 41 |
| 4.4.2.7 Pesquisa de ácidos voláteis | 42 |
| 4.5 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES | 42 |
| 4.5.1 Extrato bruto etanólico..... | 42 |
| 4.5.1.1 Determinação de cor, pH e teor de sólidos | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5.2 Partição dos extratos brutos etanólicos..... | 43 |
| 4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO | 43 |
| 4.6.1 Isolamento do constituinte químico | 43 |
| 4.6.2 Caracterização do constituinte químicos isolado..... | 44 |
| 4.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS | 45 |
| 4.7.1 Avaliação da toxicidade com <i>Artemia salina</i> | 45 |
| 4.7.2 Atividade hemolítica | 46 |
| 4.7.3 Avaliação da atividade antibacteriana | 47 |
| 4.7.4 Estudo da atividade alelopática | 48 |
| 4.7.4.1 Germinação..... | 48 |
| 4.7.4.2 Crescimento | 49 |
| 4.7.4.3 Respiração de raízes..... | 49 |
| 4.7.4.4 Fotossíntese..... | 50 |
| 4.7.5 Atividade antioxidante | 50 |
| 4.7.5.1 Formação do complexo fosfomolibdênio | 50 |
| 4.7.5.2 Redução do radical DPPH..... | 51 |
| 4.7.5.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) | 52 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO | 55 |
| 5.2 UMIDADE E CINZAS TOTAIS | 55 |
| 5.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO | 55 |
| 5.4 ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR..... | 56 |
| 5.4.1 Análise sistemática do extrato aquoso 20% | 56 |
| 5.4.2 Análise sistemática do extrato hidroalcoólico 20%..... | 57 |
| 5.5 PARTIÇÃO DAS FRAÇÕES | 58 |
| 5.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO ISOLADO | 59 |
| 5.6.1 Composto FH-39..... | 59 |
| 5.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS | 66 |
| 5.7.1 Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> | 66 |
| 5.7.2 Atividade hemolítica | 67 |
| 5.7.3 Avaliação da atividade antibacteriana | 70 |
| 5.7.4 Estudo da atividade alelopática..... | 70 |

| | |
|---|-----------|
| 5.7.4.1 Germinação..... | 71 |
| 5.7.4.2 Crescimento | 73 |
| 5.7.4.3 Respiração das raízes..... | 76 |
| 5.7.4.4 Fotossíntese..... | 77 |
| 5.7.5 Atividade antioxidante | 79 |
| 5.7.5.1 Formação do complexo fosfomolibdênio | 79 |
| 5.7.5.2 Redução do radical DPPH..... | 82 |
| 5.7.5.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS..... | 86 |
| 6 CONCLUSÃO | 89 |
| REFERÊNCIAS | 91 |

1 INTRODUÇÃO

Em muitas localidades, as plantas ainda são a única alternativa de tratamento para recuperação e manutenção da saúde. Além disso, muitas pessoas optam por tratamentos a base de produtos naturais imaginando que a utilização de medicamentos sintéticos possa vir acompanhada de algum efeito indesejado (ABIFISA, 2009).

A prática do uso de plantas medicinais no Brasil é muito comum em tratamento terapêutico e científico e, até mesmo, em ritos religiosos. Buscar na natureza uma forma de sanar enfermidades ocorre há muitos anos, principalmente porque nem todos os medicamentos estão disponíveis ou é de fácil acesso a todas as pessoas. Nas plantas medicinais a população revela o seu conhecimento ao utilizá-las em seu próprio benefício (VICTÓRIO; LAGE, 2008).

As plantas medicinais são utilizadas amplamente na assistência primária a saúde devido aos metabólitos secundários que elas desenvolvem. Essas substâncias ativas podem ser alcaloides, compostos fenólicos, óleos essenciais, entre outros. Devido a isso, observa-se uma frequente utilização de plantas medicinais na Ásia, Europa e América Latina. Dessa forma, 75% da população mundial, aproximadamente, fazem o uso de plantas medicinais para tratar enfermidades (KOSEKI *et al.*, 2002).

Apenas o comércio de plantas medicinais no Brasil, de acordo com Zucchi (2009), é de aproximadamente 800 milhões de dólares anuais, sendo o equivalente a 10% do mercado brasileiro de medicamentos. Mas o comércio deste tipo de planta pode alcançar 30% do mercado farmacêutico mundial em um período de 10 anos.

Apesar do grande uso das plantas medicinais, Hostettman *et al.* (2003) apontaram que apenas 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu emprego medicinal, aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Assim, demandando um enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos.

Segundo Simões *et al.* (2007), o Brasil possui 350.000 a 550.000 espécies vegetais, sendo que apenas 55.000 dessas espécies estão catalogadas. Assim, isso demonstra que há pouca exploração da riqueza vegetal no Brasil, refletindo,

consequentemente, em poucos trabalhos com estudos fitoquímicos da nossa diversidade (YUNES; CALIXTO, 2001).

Apesar disso, fármacos utilizados clinicamente são descobertos através de screening das plantas medicinais, levando assim a novos agentes ativos farmacológicos (FUNKE; MELZIG, 2006).

Devido a isso, a referida pesquisa justifica-se à medida que espécies do mesmo gênero da espécie *Senecio westermanii* Dusén possuem alcaloides e flavonoides de interesse biológico. Além da espécie não possuir descrição fitoquímica dos seus metabólitos. Assim, o trabalho tem como objetivo a elucidação de alguns componentes químicos da planta além da avaliação de suas atividades biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a composição química da espécie *S. westermanii* e suas possíveis atividades biológicas para uma prévia avaliação do potencial desta espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover a extração, isolamento e identificação de alguns compostos químicos presentes na espécie;
- Avaliar a toxicidade do extrato bruto e frações frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- Verificar a presença de atividade hemolítica do extrato bruto e frações;
- Estudar a atividade antibacteriana do extrato bruto e frações;
- Analisar a atividade alelopática do extrato bruto e frações sobre as sementes de *Lactuca sativa*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações através dos ensaios Fosfomolibdênio, DPPH e TBARS.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae também conhecida como Compositae possui aproximadamente 1.600 gêneros e mais de 23.000 espécies (ANDERBERG *et al.*, 2007). No Brasil existem aproximadamente 2.000 espécies e 250 gêneros segundo Lorenzi e Souza (2008). Dentro da família Asteraceae encontram-se as margaridas e os girassóis, sendo a família mais diversificada de plantas com flores na Terra. A característica morfológica mais proeminente dessa família é o capítulo, um conjunto de flores sésseis lotados em um receptáculo e uma unidade reprodutiva eficiente (BARREDA, 2010). Mas são plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente ervas, arbustos, trepadeiras, terrícolas, tupícolas, epífitas e raramente árvores (HEYWOOD, 1993).

Para Barroso (1991); Joly (1991) e Bremer (1994) as espécies dessa família são distribuídas em três grandes subfamílias: Asteroideae, Barnadesioideae e Cichorioideae. As quais estão distribuídas e representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO, 1991; JOLY, 1991).

De acordo com Bremer (1994) existem 17 tribos para essa família, as quais podem ser divididas dentro das três subfamílias: Asteroideae (tribos: Athemideae, Astereae, Calenduleae, Eupatorieae, Gnaphalieae, Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Plucheeae e Senecioneae); Barnadesioideae (tribo: Barnadesieae) e Cichorioideae (tribos: Arctoteae, Cardueae, Lactuceae, Liabeae, Mutisieae e Vernonieae). Mas para Anderberg *et al.* (2007), a família Asteraceae está dividida em cinco subfamílias, tais como: Asteroideae, Barnadesioideae, Carduoideae, Cichorioideae e Mutisioideae. Além da família se distribuir em 24 tribos.

Na família Asteraceae há inúmeras espécies utilizadas na medicina popular em diversas regiões do Brasil. Dentre elas podemos citar a espécie *Bidens pilosa* L., popularmente conhecida como “picão-preto”, esta espécie possui diversas indicações terapêuticas, mas é utilizada principalmente como antiinflamatória (MATOS, 2009).

A espécie *Lychnophora salicifolia* Mart conhecida popularmente como “arnicão” (GOUVEA, 2010) também é utilizada devido seu efeito antiinflamatório. Além dessas espécies, pode-se citar na medicina popular brasileira o uso de *Baccharis trimera* Less. (carqueja), *Mikania glomerata* Spreng (guaco) e *Vernonia condensata* Backer (boldo), respectivamente, são utilizados para problemas digestivos e hepáticos; broncodilatador e expectorante; distúrbios do fígado e estômago (ROBINSON, 1999; SEMIR, 1991).

A Figura 1 expõe a ampla distribuição da família Asteraceae no território nacional. São plantas que possuem seu domínio fitogeográfico na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica, Pampa e Pantanal (BORGES, 2012).



FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DA FAMÍLIA ASTERACEAE NO BRASIL

FONTE: BORGES (2012)

Além disso, a Figura 2 mostra o número de nomes aceitos de espécies da família Asteraceae por região brasileira.

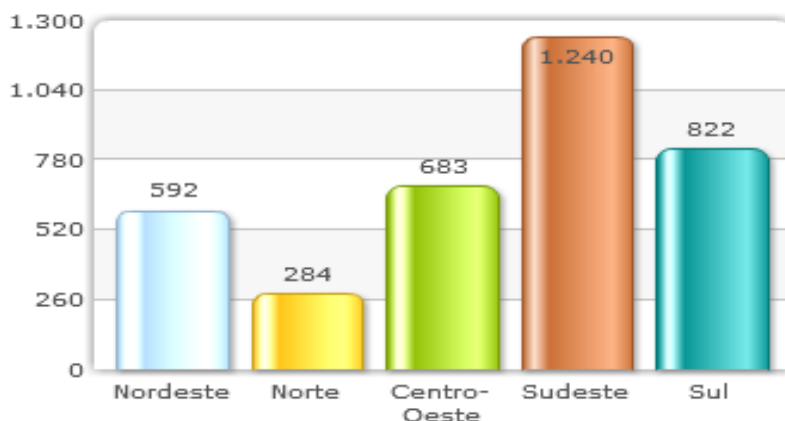


FIGURA 2 – NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIE DA FAMÍLIA ASTERACEAE POR REGIÃO

FONTE: BORGES (2012)

Devido a família Asteraceae possuir inúmeras espécies, dessa forma as características microscópica e macroscópicas são variadas.

Assim, as folhas podem ser fendidas ou inteiras, com disposição alternas ou opostas, latentes ou não (JOLY, 1985). O limbo é simples, pode ser inteiro, dissecto, pinatífido, lobado, pinatissecto ou terminado em gavinha (LORENZI; SOUZA, 2008).

As flores formam capítulos além de possuírem simetria radial ou zigomorfa, sendo hermafroditas ou sexo separado. Além disso, são pentâmeras, com cálice modificado, transformado no papilho, sendo este piloso (*Senecio*) ou espinhoso. O corola dessas flores são pentâmeros com 5 lobos, podendo variar de iguais, lingulada ou até mesmo bilabiado. O androceu é formado por 5 estames férteis com filetes livres e anteras introrsas, que é atravessado pelo estilete. O ovário é sempre ínfero, com um óvulo erecto apenas, unilocular e bicarpelar. Possui fruto seco indeiscente disperso pelo vento ou encerrado no capítulo, com brácteas duras e espinhosas (JOLY, 1985).

Os capítulos podem conter apenas flores linguladas (*Cichorium* e *Taraxacum*) ou bilabiadas (*Mutisia*), flores linguladas nos bordos e tubulosas no centro (*Senecio*) ou só flores tubulosas iguais (*Vernonia* e *Eupatorium*). Além disso, os capítulos podem ser formados por bracteólas para cada flor, além de suas brácteas externas. Assim, diz-se que o receptáculo é paleáceo (JOLY, 1985).

Seus frutos apresetam formas variadas, idumentados até glabro, e são denominados de cipsela (BREMER, 1994). Alguns autores denominam os frutos dessa família como aquênio (BARROSO, 1991).

3.2 GÊNERO *Senecio*

O gênero *Senecio* L. possui mais de 3000 espécies distribuídas no mundo todo (MATZENBACHER, 1998). Dessa forma, encontram-se presentes na Europa, África, Américas Central e do Sul. É um gênero constituído de ervas anuais ou perenes, ocorrendo sob a forma de arbustos ou arvoretas de porte variado (CABRERA; KLEIN, 1975).

Muitas espécies do gênero *Senecio* L. são estudadas quimicamente por serem taxonomicamente diversas. Os alcaloides pirrolizidínicos e os sesquiterpenos com um esqueleto de furoeremofilano são os componentes principais do gênero *Senecio* L. (BOHLMANN *et al.*, 1977). A ocorrência dos alcaloides pirrolizidínicos pode ser comprovada nos trabalhos de Roeder *et al.* (1988), Hariprasath *et al.* (2012), Zdero *et al.* (1990), Macel *et al.* (2002) e Pelser *et al.* (2005).

Mas além desses compostos, há muito outros isolados a partir desse mesmo gênero. Dessa forma, segundo Mansour e Saleh (1980) e (1981), Mezache *et al.* (2009) e Hariprasath *et al.* (2012) a presença de flavonoides ocorrem nas espécies de *S. gallicus*, *S. candicans* e *S. erraticus*.

Outros metabólitos como triterpenóides (ABDO *et al.*, 1992) monoterpenoides (PÉREZ, 1999) e sesquiterpenoides (DUPRÉ *et al.*, 1991; BOHLMANN; ZIESCHE, 1981).

Segundo Francescato *et al.* (2007) uma das principais razões do gênero *Senecio* L. ser utilizado na medicina popular é devido as diferentes classes de metabólitos secundários presente nesse gênero.

No Brasil, a espécie *S. brasiliensis* (Sprengel) Less é utilizada para ferimentos de pele e como vermífuga. Enquanto a espécie *S. sonchifolius* (L.) Moench como diurética e antiasmática, além do seu uso para faringite, amigdalite e afecções das vias urinárias (BOLZAN *et al.*, 2007).

Já em outros países, espécies como *S. tephrosioides* Turcz, *S. canescens* var. *canescens* e *S. culcitoides* Schultz-Bip são utilizadas para tosse e bronquite. Enquanto as espécies *S. atacamensis* Phil., *S. adenophyllus* Meyen et Walp, *S. papii* Ricardo et Martic e *S. puchii* Phil são utilizadas para dor no estômago (BOLZAN *et al.*, 2007).

Mas, além do uso na medicina popular, também pode-se encontrar algumas atividades biológicas relacionadas ao gênero, tais atividades são: antioxidante (LIU; NG, 2000); antiviral (FORTIN *et al.*, 2002) e antimicrobiana (LOIZZO *et al.*, 2006; GARCÍA, 2003).

A Figura 3 expõe a distribuição do gênero *Senecio* L. no território nacional, mostrando as regiões onde se pode encontrar esse gênero são as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Portanto, não sendo possível encontrar o mesmo gênero na região Norte do país. São plantas que possuem domínio fitogeográfico no Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (TELES, 2012).



FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO *Senecio* L. NO BRASIL

FONTE: TELES (2012)

Além disso, a Figura 4 mostra o número de nomes aceitos de espécies do gênero *Senecio* L. por região brasileira.

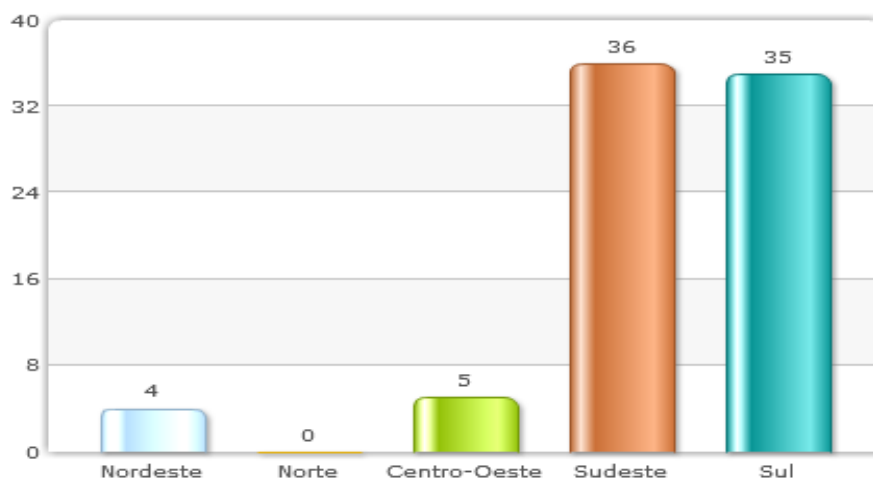


FIGURA 4 – NÚMERO DE NOMES ACEITOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Senecio* L. POR REGIÃO

FONTE: BORGES (2012)

3.3 ESPÉCIE *Senecio westermanii* DUSÉN

A espécie *S. westermanii* é uma planta nativa e endêmica do Brasil. O domínio fitogeográfico dessa espécie é a Mata Atlântica, sendo distribuída geograficamente pelo estado de São Paulo e Paraná (TELES, 2012).

Essa espécie constitui os seguintes níveis de organização, conforme Tabela 1.

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO DA ESPÉCIE *S. westermanii* Dusén

| HIERARQUIA | TAXONÔMICA |
|------------|----------------------------|
| Reino | Plantae |
| Filo | Tracheophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordem | Asterales |
| Família | Asteraceae |
| Gênero | <i>Senecio</i> |
| Espécie | <i>Senecio westermanii</i> |

FONTE: ARCTOS (2014)

A Figura 5 expõe a distribuição da espécie *S. westermanii* Dusén nos estados do Paraná e São Paulo.



FIGURA 5 – REGIÕES HABITADAS PELA ESPÉCIE *S. westermanii* Dusén

FONTE: TELES (2012)

A Figura 6 mostra a espécie em estudo no local da coleta.



FIGURA 6 – FOTOGRAFIAS DA ESPÉCIE *Senecio westermanii* Dusén NO LOCAL DA COLETA

FONTE: O autor (2014)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *S. westermanii* foi coletada no mês de março de 2012 na Estrada da Graciosa, localizada no município de Quatro Barras - PR, nas proximidades das coordenadas 25°18'27"S e 48°56'37"W.

A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo Biólogo e Curador da Universidade Federal do Paraná Osmar dos Santos Ribas do Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba-PR, onde está depositada a exsicata sob o número 379066, representada pela Figura 7.



FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *S. westermanii*

FONTE: O autor (2014)

As partes coletadas foram caule e folha que foram secas e estabilizadas em local fresco e arejado, protegidas de raios solares e umidade. O período de secagem foi de aproximadamente dois meses. As partes aéreas foram trituradas com auxílio de um moinho, para aumentar a superfície de contato do material com o solvente no momento da extração (SONAGLIO *et al.*, 1999).

4.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

O método utilizado para a determinação de umidade das partes aéreas de *S. westermanii* foi o gravimétrico. Esse ensaio foi destinado a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada (BRASIL, 2010).

Foram utilizados seis cadinhos, previamente dessecados, resfriados em dessecador e pesados. O material foi submetido à estufa a 100-105°C durante, 2 horas e resfriados em dessecador. Em seguida, o cadinho voltou à estufa até que se observou peso constante, não diferindo por mais de 5 mg entre as duas pesagens.

O resultado foi dado pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco, através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

P_a = peso da amostra;

P_u = peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação;

P_s = peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

4.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

Para a determinação de cinzas totais das partes aéreas de *S. westermanii*, foi empregado o método gravimétrico descrito em Brasil (2010). Esse processo teve como objetivo estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis no processo de incineração.

Foram utilizados seis cadinhos, previamente calcinados em mufla a 600°C durante um período de 30 minutos. O material foi incinerado na mesma temperatura de calcinação durante um período de 6 horas, até eliminação total do carvão. Após a incineração, os cadinhos foram esfriados em dessecador.

Em seguida, procedeu-se a pesagem do resíduo presente e efetuados os cálculos em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal original, através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

P_1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (tarado cadinho);

P_2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P_3 = Peso da amostra inicial.

4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Para o estudo fitoquímico foram realizados ensaios que se utilizavam de reações de coloração e/ou precipitação para mostrar as características qualitativas dos principais grupos químicos dos componentes ativos da droga vegetal.

Os compostos pesquisados no extrato hidroalcoólico foram: flavonoides, alcaloides, esteroides e/ou triterpenos, cumarinas, iridoides e antraquinonas.

O ensaio sistemático de análise fitoquímica foi realizado de acordo com Moreira (1979), com adaptações realizadas por Miguel (2003), pelo método de

maceração a quente, partindo de um extrato hidroalcoólico a 20% do vegetal em estudo. Além dos testes realizados a partir do extrato aquoso a 20%.

Foi preparado um extrato hidroalcoólico uma vez que o objetivo foi analisar as partes aéreas (caule e folha) juntas. A partir do extrato foi verificado pH, teor de sólidos, cor, odor e sabor.

4.4.1 Preparo do extrato hidroalcoólico 20%

Foram pesados 40 g das partes aéreas da planta fragmentada e realizou-se uma maceração em 200 mL de álcool etílico a 70% em banho-maria a 70° C por 1 hora. Após, o macerado foi filtrado em papel de filtro e lavado com o líquido extrator até completar o volume de 200 mL.

Em seguida, procedeu-se com a partição do extrato hidroalcoólico com solventes de polaridade crescente. Dessa forma, os solventes utilizados foram o hexano, clorofórmio e acetato de etila, os quais serviram para orientar, por solubilidade, os grupos químicos a serem pesquisados.

Assim, concentrou-se o extrato hidroalcoólico até adquirir 1/3 do seu volume para retirar o excesso de álcool etílico, posteriormente colocou-se o extrato em um funil de separação para dar seqüência ao particionamento.

Adicionou-se 20 mL do primeiro solvente e separou-se, após agitação, a fração dissolvida no mesmo. Repetiu-se esse procedimento por 10 vezes. O procedimento foi repetido com os demais solventes chegando-se a 4 frações de 200 mL cada. Assim, obtiveram-se as frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Até que todos os ensaios fossem realizados as frações foram mantidas refrigeradas.

4.4.1.1 Pesquisa de flavonoides

Esta pesquisa baseou-se na modificação da estrutura do flavonoide em presença de ácido, como na reação de Shinoda ou cianidina, com HCl concentrado e magnésio em pó. Com essa reação pode-se caracterizar compostos contendo um núcleo α -benzopirona, pelo desenvolvimento de cor laranja a vermelha.

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. Para a fração hidroalcoólica não houve a necessidade de secar. Adicionou-se 10 mL de etanol nas cápsulas com resíduo seco e foi transferido 5 mL para cada tubo de ensaio, inclusive 5 mL da fração hidroalcoólica. A cada tubo de ensaio adicionou-se 200 mg de limalha e ácido clorídrico fumegante (lentamente) com ocorrência de reação exotérmica (esta pesquisa será realizada com os tubos de ensaio dentro de um copo de béquer com gelo, dentro da capela).

A reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavonas com coloração amarela a vermelho; flavonol e dihidroflavonol com coloração vermelho a vermelho sangue; flavononas com coloração vermelha a violeta; derivados antociânicos com coloração vermelha tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

a) Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL de cada fração. Ao resíduo foi adicionado 5 gotas de acetona e 30 mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitou e levou-se novamente à secura. Ao resíduo foi adicionado 5 mL de éter etílico e foi transferido os respectivos resíduos para tubos de ensaio para verificação de fluorescência.

Esta reação é explicada pela formação de quelatos, que nos flavonoides, desenvolvem o aparecimento de fluorescência amarela esverdeada, enquanto que as flavonas e isoflavonas não apresentam esta propriedade. Os antociânicos coram-se, porém não produzem fluorescência.

b) Ensaio de Pacheco

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Adicionaram-se alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético e foi aquecido em fogareiro. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de HCl concentrado.

Os diidroflavonóis produzem um efeito batocrômico das bandas I e II, apresentando uma coloração roxa característica. Enquanto as flavonas, chalconas, auronas e os flavonóis, dão resposta negativa.

c) Ensaio com Zn e HCl

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila. O resíduo foi dissolvido com 10 mL de etanol, por isso não houve necessidade de secar a fração hidroalcoólica. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 5 mL do conteúdo das cápsulas, juntou-se uma pastilha de zinco e lentamente HCl fumegante. Essa reação é exotérmica e foi realizada em copo de becker contendo gelo e sob a capela.

Apenas os diidroflavonóis produzem coloração rocha violeta. As flavononas e flavonol não produzem coloração.

d) Pesquisa de leucoantocianidinas

Transferiu-se para cada cápsula de porcelana 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila e levará à secura. A cápsula com a fração hidroalcoólica não houve necessidade de secar.

Dissolveu-se o resíduo nas cápsulas com 5 mL de álcool etílico e adicionou-se 5 gotas de HCL concentrado, aquecendo.

As leucoantocianidinas são consideradas flavonoides monoméricos 3,4-dióis ou raramente 4-óis. Na reação positiva observa-se o desenvolvimento de coloração vermelha.

4.4.1.2 Pesquisa de alcaloides

Esta técnica é baseada na capacidade que os alcaloides possuem quando em estado de sal (extratos ácidos), de combinar-se com o iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio, tungstênio, formando precipitados.

Para esta pesquisa utilizou-se os reativos gerais para alcaloides: Mayer (iodo-mercurato de potássio), Dragendorff (iodo-bismutato de potássio) e Bouchardat (iodo-iodeto de potássio).

Levou-se à secura 50 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, em banho-maria a 70°C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Transferiu-se 2 mL do extrato clorídrico para 5 tubos de ensaio e adicionou-se em cada tubo duas gotas dos reativos gerais para alcaloides, mantendo o quinto tubo como branco.

O aparecimento de precipitado indica reação positiva, sendo este precipitado branco para o reativo de Mayer, cor tijolo para o reativo de Dragendorff e alaranjado para o reativo de Bouchardat.

4.4.1.3 Pesquisa de cumarinas

As cumarinas são caracterizadas pela observação sob luz ultravioleta (UV) em 360 nm, já que a maioria possui fluorescência azul brilhante ou verde.

A pesquisa baseou-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido hidroxí cinâmico, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e conseqüente formação do ácido hidroxí cinâmico ou sais de seu ânion. Ao irradiar luz ultravioleta, a forma cis migra para forma trans, que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos.

Neste ensaio concentrou-se 30 mL de cada fração hexano, clorofórmio e acetato de etila, até volume de 5 mL.

Da fração hidroalcoólica foram transferidos 30 mL para uma cápsula de porcelana e acidificada com HCl 2N até pH 1. Concentrou-se em banho-maria até

volume de 5 mL. Após o esfriamento transferiu-se para um funil de separação e foram extraídas 2 vezes com 10 mL de éter etílico. As frações etéreas foram concentradas em banho-maria até volume de 5 mL.

Transferiu-se para cada tubo de ensaio 3 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a etérea, adicionou-se 2 mL de NaOH 1N e esses tubos foram levados a uma câmara de luz ultravioleta em 366 nm, deixando-os expostos por 15 minutos. No caso então de reação positiva observa-se o aparecimento de fluorescência com coloração azul ou verde amarelada.

Além disso, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro.

As manchas 1 e 2 foram tratadas com NaOH 1N e, sobre a mancha 1, colocou-se uma moeda, depois foram levadas à câmara de ultravioleta a 365nm, novamente deixando em exposição por 15 minutos. A reação é tida como positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.4.1.4 Pesquisa de antraquinonas e naftoquinonas

Foi levado à fervura 30 mL do extrato alcoólico em um balão, por 15 minutos sob refluxo adicionando 5 mL de ácido sulfúrico 10 %. Antes de esfriar, filtrou-se em papel filtro e adicionou-se ao filtrado 30 mL de água destilada. Com um funil de separação, separou-se a fração orgânica das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração hidroalcoólica foi extraída com 10 mL de éter etílico por duas vezes. Concentrou-se as frações até aproximadamente 5 mL e transferiu-se para um tubo de ensaio, efetuando-se a reação de Bornträger. Ou seja, adicionou-se 5 mL de hidróxido de amônia, agitando lentamente.

O aparecimento de coloração avermelhada indicará a presença de antraquinonas e/ ou naftoquinonas.

4.4.1.5 Pesquisa de esteroides e triterpenos

Foram evaporados 30 mL de cada fração em banho-maria e, com o auxílio de um bastão seco, dissolveu-se com clorofórmio e filtrou-se. Em seguida, foram pipetados 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico de cada fração para 3 tubos de ensaio, completando-os para o volume de 2 mL com clorofórmio. Realizou-se a reação de Libermann Bouchard, em capela, adicionando-se 1,0mL de anidrido acético e 2,0mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente.

O desenvolvimento de coloração rósea escura ou azul é um indicativo da presença da função carbonila na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Enquanto que a coloração verde indica função hidroxila na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Quando ocorre o desenvolvimento de coloração amarela, possivelmente existe a presença de metila em C14. A coloração verde demonstra a presença de esteroides e /ou triterpenos.

a) Reação de Keller Kelliani

Transferiu-se para 4 tubos de ensaio 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, e hidroalcoólica, em seguida, levou-se à secura. Após, o resíduo foi dissolvido com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. Transferiu-se a mistura cautelosamente para um tubo de ensaio que continha 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos ou na fase acética indica reação para desoxiaçúcares. A coloração azul indica a presença de esteroides, enquanto a coloração verde indica a presença de triterpeno.

4.4.2 Preparo do extrato aquoso 20%

Preparou-se o extrato aquoso 20% pelo processo de maceração à quente em banho-maria a 70°C por uma hora, utilizando 40 g de material vegetal e 200mL de água destilada (líquido extrator). Decorrida uma hora, retirou-se o frasco do banho-maria, filtrou-se o extrato e o volume completado até 200 mL com o líquido extrator, lavando o material.

Este extrato foi submetido aos testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

4.4.2.1 Pesquisa de antocianinas

A antocianinas são pigmentos hidrossolúveis presentes nas plantas, com colorações que modificam de acordo com o pH. Com ácidos, as antocianinas reagem formando sais de oxônio corados de vermelho e com bases reagem com hidroxilas fenólicas livres e adquire coloração azul devido à estrutura quinóide.

Para realização deste ensaio, transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, acidificou-se o primeiro tubo com ácido clorídrico 1% (pH aproximadamente 4), alcalinizou-se o segundo tubo com hidróxido de amônio (pH aproximadamente 10) e neutralizou-se o terceiro tubo (pH 7).

O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino, ou violáceo em meio neutro, indica reação positiva.

4.4.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Agitou-se, energicamente com movimentos succionais, por cinco minutos os tubos da pesquisa de antocianinas, deixando-os em repouso por trinta minutos.

Mediu-se a altura do anel de espuma, formado logo após agitação e decorrido trinta minutos.

Reação positiva é indicada com desenvolvimento de espuma com altura superior a um centímetro e persistente após o repouso.

As saponinas apresentam estruturas com assimetria hidrófilo-hidrofóbica, fazendo com que haja redução da tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com consequente formação de espuma mediante agitação (ROBBERS *et al.*, 1997).

4.4.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Os heterosídeos cianogenéticos produzem ácido cianídrico nas plantas e são acompanhados por enzimas (b-glicosidases) responsáveis pela catálise da hidrólise (ROBBERS *et al.*, 1997).

Para este ensaio utilizou-se a reação do isopurpurato de sódio, que ocorre na transferência para um tubo de ensaio de 5 mL de extrato aquoso (cuidando-se para não umedecer as paredes do tubo de ensaio), adição de 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1N, suspensão de uma tira de papel picro-sódico no tubo e encaminhamento ao banho-maria por trinta minutos à 60°C.

Reação positiva é observada com a formação de isopurpurato de sódio que apresenta coloração castanha a avermelhada.

O papel picro-sódico é preparado embebendo tiras de papel de filtro com 1 cm de largura em solução de ácido pícrico 1% e secando-as ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

4.4.2.4 Pesquisa de taninos

Os taninos são divididos em duas classes considerando os núcleos fenólicos existentes e na união destes. Os taninos hidrolisáveis apresentam ácido gálico ou ácido hexaidroxidifênico com seus derivados esterificados com glicose. Estes ésteres são facilmente hidrolisados em ácidos fenólicos e açúcar (ROBBERS *et al.*,1997).

Os taninos condensados contêm núcleos fenólicos que muitas vezes estão ligados a carboidratos ou a proteínas. A maioria dos taninos condensados são resultantes da condensação de dois flavan-3-óis, ou mais (catequina) ou de flavan-3,4-dióis (leucocianidina) (ROBBERS *et al.*,1997).

Para a pesquisa de taninos foram adicionos três a cinco gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico a 1 mL de extrato aquoso. Reação positiva para taninos desenvolve coloração azul. O desenvolvimento de coloração verde indica flavonoides e coloração marrom indica polifenóis.

Além dessa reação, foi realizado o ensaio de Staniasny que utiliza formol clorídrico. Assim, foram transferidos 30 mL de extrato aquoso para um balão de fundo chato com 250 mL de capacidade e adicionou-se 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. Acoplou se o balão a um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante uma hora. Decorrido o tempo, deixou-se esfriar e filtrou-se o extrato formol-clorídrico reservando o filtrado para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Lavou-se o resíduo da filtração com uma solução de etanol 50%, gotejando sobre o resíduo da lavagem gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Reação positiva para taninos condensados visualiza-se com desenvolvimento de coloração verde ao gotejar o hidróxido de potássio.

Utilizou-se o filtrado reservado e adicionou-se excesso de acetato de sódio, sem agitação e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Reação positiva para taninos hidrolisáveis visualiza-se com desenvolvimento de coloração azul ao adicionar o cloreto férrico.

4.4.2.5 Pesquisa de amino grupos

Com auxílio de um condensador de bolas e temperatura de 60°C, concentrou-se 10 mL de extrato aquoso até 5 mL. Em tira de papel de filtro, adicionaram-se cinco gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, nebulizou-se o papel de filtro com solução de ninhidrina levando-o à estufa (95-100°C) durante quinze minutos. Reação positiva é visualizada com o aparecimento de coloração azul-violácea.

4.4.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Transferiram-se 20 mL de extrato aquoso e 2 mL de hidróxido de sódio 1N para balão de fundo chato com 100 mL de capacidade, acoplou-se um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante trinta minutos. Decorrido o tempo, esfriou-se e acidificou-se o extrato alcalino com solução de ácido sulfúrico 1N. Procedeu-se extração, com auxílio de um funil de separação, com 10 mL de éter etílico (três vezes).

Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativado, filtrados e levados à secura em banho-maria a 50°C. Aqueceu-se o resíduo em estufa à 100°C por dez minutos, esfriou-se, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio 1N e filtrou-se. Adicionaram-se três gotas do filtrado anterior a um papel de filtro, obtendo-se uma mancha com aproximadamente um centímetro de diâmetro e pingou-se sobre esta mancha uma gota de reagente de Nessler. Para controle negativo utilizou-se uma mancha com o reativo de Nessler. Levou-se o papel de filtro à estufa por cinco minutos. Visualiza-se reação positiva com o aparecimento de coloração marrom.

4.4.2.7 Pesquisa de ácidos voláteis

Com solução de ácido sulfúrico 1N, acidificou-se 10 mL de extrato aquoso. Colocou-se o extrato ácido em tubo de ensaio e levando à fervura, determinou-se o pH dos vapores com auxílio de fita indicadora de pH presa ao tubo com rolha de cortiça.

O aparecimento de pH abaixo de sete indica presença de ácidos voláteis.

4.5 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

4.5.1 Extrato bruto etanólico

O extrato bruto das partes aéreas foi preparado em sistema fechado a quente no aparelho de Soxhlet, utilizando-se como solvente extrator o álcool etílico absoluto (PA).

Terminada as extrações, cada material será filtrado e concentrado em evaporador rotatório até adquirir aspecto de extrato fluido.

4.5.1.1 Determinação de cor, pH e teor de sólidos

Após o preparo do extrato, foram realizados a determinação de cor, pH e teor de sólidos. Para determinação de cor e pH utilizou-se a verificação feita pelo observador e tira indicadora da Merck[®], respectivamente.

O teor de sólidos baseou-se e na eliminação total da fase líquida por secagem do produto proveniente da extração dos componentes solúveis. Para esta determinação, depositou-se 1 mL do extrato bruto etanólico em placa de petri, previamente seca e tarada. Em seguida, foram levadas à estufa a 100 °C até peso

constante e procedeu-se aos cálculos onde o resultado foi apresentado em quantidade de sólidos em porcentagem em relação a massa do material vegetal seco coletado.

4.5.2 Partição dos extratos brutos etanólicos

Segundo Carvalho (2001) o extrato bruto etanólico foi obtido e fracionado separadamente, por meio de partição líquido-líquido em aparelho de soxhlet modificado, com solventes de polaridade crescente. Foram obtidos dessa forma as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente.

Todo o sistema foi levado ao aquecimento e deixado em refluxo contínuo por aproximadamente 6 horas para que os solventes pudessem realizar uma adequada extração.

4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO

4.6.1 Isolamento do constituinte químico

Após a obtenção da fração hexano foi realizada uma coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária sílica gel 60 Merck® (0,063 – 0,200mm) e fase móvel a mistura dos solventes hexano e acetato de etila, inicialmente partindo-se de 100% hexano até 100% acetato de etila. As misturas foram realizadas utilizando um volume máximo de 100 mL, aumentando-se o gradiente de polaridade de 5 mL em 5 mL. No final desse processo, foram utilizados 50 mL de metanol para extrair compostos de maior polaridade.

Foram utilizados 155 frascos de aproximadamente 10 mL para a coleta do eluato. Porém foram selecionados apenas os frascos 39 ao 45, os quais

apresentaram cristais. Em seguida esses frascos foram lavados com éter de petróleo para retirada da clorofila.

A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 F 254 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra e levada à secar em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização.

Esta técnica, que se utiliza de processos cromatográficos para análise e identificação de compostos de um determinado extrato, segue princípios básicos como: montagem de coluna ou placa; aplicação da amostra; passagem do eluente escolhido (fase móvel) através da fase estacionária; revelação/visualização das diferentes zonas de separação dos compostos; e/ou extração das substâncias retidas na fase estacionária. Além disso, a cromatografia em coluna é uma das mais utilizadas para a separação e isolamento dos constituintes do extrato analisado (SIMÕES *et al.*, 2007).

Para auxiliar a separação foi realizada cromatografia de camada delgada (CCD) preparativa, que constituiu na união das amostras dos frascos 39 ao 45 da coluna cromatográfica e aplicação da amostra com o auxílio de um capilar em placas cromatográficas com sílica-gel GF 254nm (20 cm de largura e 10 cm de altura). A aplicação foi realizada em forma de linha ou barra. Em seguida, a placa foi mantida em contato com a fase móvel (tolueno 93% e acetato de etila 7%), em recipiente fechado, até saturação da cuba. As bandas formadas foram raspadas e o resíduo ressuspensionado em clorofórmio.

Posteriormente foi realizada a filtração para separar a sílica da CCD da substância dissolvida no seu solvente. A sílica ficou retida no filtro sinterizado e o eluato foi coletado em um frasco previamente tarado. O frasco com a amostra foi levado à secar e finalmente quantificada a substância isolada.

4.6.2 Caracterização do constituinte químicos isolado

Para a identificação do isolado obtido no processo de separação foi utilizado a metodologia de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, utilizando o

aparelho RMN Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente.

4.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.7.1 Avaliação da toxicidade com *Artemia salina*

Foram adquiridos os ovos de crustáceo da espécie *Artemia salina* e procedeu-se ao preparo do ensaio conforme metodologia citada por Meyer *et al.* (1982).

Os ovos do crustáceo foram eclodidos em água salina, preparada com 14,31 g de sal marinho e dissolvido em 400 mL de água purificada. Para esta quantidade, foram adicionados 200 mg dos ovos do crustáceo. O pH foi mantido entre 8,0 e 9,0 para evitar a morte dos crustáceos. A temperatura foi controlada entre 27°C e 30°C e a solução foi mantida sob agitação e aeração constante por 48 horas. Nas primeiras horas do processo foi mantida iluminação (20 W) sobre o recipiente.

Foi preparada uma solução com o extrato e frações em concentrações de 1000 $\mu\text{L/mL}$, 100 $\mu\text{L/mL}$ e 10 $\mu\text{L/mL}$, todos em triplicata. Foram colocados 10 crustáceos em cada frasco para possibilitar posteriormente a visualização dos crustáceos vivos.

Os frascos com as soluções foram colocados em estufa para total eliminação do solvente (metanol), inclusive a do controle que utilizará apenas o solvente utilizado na dissolução das amostras. Após a evaporação do mesmo, os crustáceos serão adicionados ao frasco com a ajuda de conta gotas de vidro, totalizando 10 em cada amostra adicionará salina suficiente para acomodar e visualizar os crustáceos.

Após 24 horas serão observados quantos deles morrerão em presença das concentrações analisadas, procedendo-se aos cálculos de DL_{50} através do método estatístico Probitos com 95% de intervalos de confiança. As frações serão consideradas ativas quando DL_{50} for menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982).

4.7.2 Atividade hemolítica

A determinação das porcentagens de hemólise foi realizada segundo método de Banerjee *et al.* (2008), adaptado.

Foram transferidos 5 mL de sangue de carneiro de origem comercial da empresa Newprov[®], previamente homogeneizado sob leve agitação, para um tubo de ensaio e centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm com PBS gelado. Foram realizadas 6 lavagens sequenciais com PBS e descartando-se sempre o sobrenadante. Na última lavagem o sobrenadante encontrou-se incolor. Em seguida, foi realizado uma diluição a 2% com a papa de eritrócito utilizando como diluente o PBS.

Para a realização da prova de hemólise foram preparados eppendorfs com hemólise a 100% (controle positivo), hemólise basal (branco), controle solvente e os testes (amostras). Na realização do controle positivo foram pipetados 200 µL de água potável em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Enquanto para o branco foram pipetados 200 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. No controle solvente foram adicionados 20 µL de etanol mais 180 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Para o preparo das amostras foram preparadas soluções nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Para dissolver melhor as amostras foi adicionado 10% de etanol do volume total de cada amostra. Todas as amostras, os controles e o branco foram realizados em triplicatas.

Em seguida os eppendorfs foram uniformemente homogeneizados com leve agitação manual. Após foram incubados durante 3 horas em estufa com temperatura controlada a 37°C. Ao término da incubação os eppendorfs foram centrifugados em centrífuga Minispin Plus da empresa Eppendorf[®] a 3000 rpm durante 5 minutos.

A leitura da absorbância foi realizada em microplaca de Elisa de 96 poços, para onde foram pipetados 300 µL do sobrenadante das amostras. A leitura foi realizada no fotômetro de microplaca Multiscan FC da empresa Thermo Scientific[®]. A leitura foi realizada a 540nm.

4.7.3 Avaliação da atividade antibacteriana

Para a avaliação do potencial antibacteriano da espécie *S. westermanii* foi utilizado o método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) segundo metodologia do CLSI (2009).

O extrato bruto e frações foram testados frente ao desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

As amostras foram preparadas através de diluição seriada em 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha), em um intervalo de concentração de 1000 µg/mL a 7,81 µg/mL em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland. Em seguida, foram inoculadas em um volume de 5 µL nos orifícios, permanecendo uma concentração final de 10^4 UFC/mL.

O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes, etanol e DMSO, foram realizados adicionando-se 100 µL de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 µL de MHB e 100 µL do extrato, fração ou composto isolado. O controle positivo ou de viabilidade bacteriana, foi preparado com 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20 horas. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescidos 20 µL de solução aquosa de TTC a 0,5%, conforme Ayres *et al.* (2008) e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

A formação da coloração vermelha nos orifícios das microplacas foi interpretada como ausência da atividade antibacteriana pela substância em estudo, enquanto que a não formação da coloração vermelha foi considerada como presença de atividade. A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de

inibir completamente o crescimento microbiano (ou seja, a ausência da coloração vermelha no orifício). Cada teste foi realizado em duplicata e a CIM final foi determinada de acordo com a média aritmética dos resultados obtidos.

Os valores obtidos das CIMs foram classificados em bom potencial inibitório (até 100 µg/mL); moderada atividade inibitória (entre 100-500 µg/mL); fraca atividade inibitória (entre 500-1000 µg/mL) e inativos (maiores que 1000 µg/mL) (TANAKA *et al.*, 2005; AYRES *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008).

4.7.4 Estudo da atividade alelopática

Em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos, foram colocados 5,0 mL da solução das amostras (extrato e frações), preparadas nas concentrações de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1.000 µg/mL. Em seguida, foram semeadas, aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporas da espécie alvo (alface), com quatro repetições para cada solução, conforme Brasil (2009). Com o controle o mesmo procedimento foi realizado, porém utilizando apenas água destilada.

As placas de Petri contendo as diásporas foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz interna constante a 160 W, umidade relativa (\pm 80%) e temperatura de 25°C, conforme Brasil (2009)

4.7.4.1 Germinação

Durante a germinação foram realizadas duas leituras diárias, sempre no mesmo horário, abrindo-se as placas em fluxo laminar, durante sete dias. O teste foi realizado em quatro repetições. As sementes foram consideradas germinadas quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento, que pode ocorrer devido à expansão do embrião com a embebição das frações (LABORIAU, 1983).

As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas ao Teste Scott-Knott.

4.7.4.2 Crescimento

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes *et al.*, (1987) e Macias *et al.*, (2000). Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz (radícula) e do hipocótilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado.

Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos ao Teste de Scott-Knott para comparação das médias.

4.7.4.3 Respiração de raízes

O teste de respiração das raízes foi realizado segundo Steponkus e Lanphear (1967). Foram cortadas 10 raízes a 1,0 cm a partir da coifa e transferidas para tubos de ensaio, e foram adicionados em cada tubo 5mL de cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v) e 1mL de tampão fosfato de sódio (mono e dibásico) a 0,05M (pH 7,0). Em seguida, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período os tubos foram transferidos para banho-maria a 30°C por 15 horas (ou em estufa a 40 °C).

Ao final desse tempo, a solução dos tubos foi drenada e as raízes lavadas uma vez com água destilada, que em seguida também foram drenadas ao máximo. Posteriormente foi adicionado 7 mL de etanol 95% (v/v) e então os tubos foram levados para o banho-maria com água fervente ($\pm 100^{\circ}\text{C}$) durante 15 minutos, ou até secar. Após esse período os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e acrescentado em cada tubo 10 mL de etanol 95% (v/v). Em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 530 nm. Como branco foi utilizado o etanol 95% (v/v).

4.7.4.4 Fotossíntese

Foram cortadas 10 folhas primárias inteiras e transferidas para tubos de ensaio, contendo 5,0 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) e então os tubos foram embrulhados em papel alumínio e deixados a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período as leituras das absorvâncias da clorofila a (645 nm) e b (663 nm) foram realizadas em espectrofotômetro. Como branco foi utilizado o DMSO.

O teor de clorofila total foi calculado de acordo com a equação de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila total: } 20,2 \times \text{AbsA} + 8,02 \times \text{AbsB}$$

Onde: AbsA = absorvância da clorofila a;

AbsB = absorvância da clorofila b.

4.7.5 Atividade antioxidante

4.7.5.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

O ensaio de complexação pelo fosfomolibdênio foi realizado de acordo com Prieto, Pineda e Aguilar (1999). A técnica baseia-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V, pela amostra analisada, e obtenção de um complexo fosfato-molibdênio V, de coloração verde em pH ácido, o qual é determinado espectrometricamente a 695 nm. O método possui a vantagem de avaliar, de forma simples, a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos.

Para a reação de formação do complexo foi necessário o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), sendo o volume completado

com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a serem testadas, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol.

Em um tubo de ensaio, foi pipetado uma alíquota de 0,3 mL de cada amostra, e adicionado 3 mL de reativo. O mesmo foi realizado com os padrões. O branco era constituído de 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo. A análise foi realizada em triplicata. Os tubos foram hermeticamente fechados e colocados em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorbâncias (Abs) em espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu®, modelo UV-1601 PC, em 695 nm. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina.

As seguintes fórmulas demonstram o cálculo de atividade antioxidante frente a rutina e vitamina C.

$$\text{AA\% em relação à Rutina} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

$$\text{AA\% em relação à Vitamina C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

4.7.5.2 Redução do radical DPPH

Este ensaio consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2 - difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 518 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres.

A metodologia foi realizada de acordo com Mensor *et al* (2001), que a capacidade antioxidante quantitativa tendo como base este princípio da redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV visível.

Foi preparada uma solução de DPPH minutos antes do ensaio a 0,03 mmol/mL em metanol absoluto. Foram preparadas cinco diluições de cada amostra, com concentrações que variam entre 5 µg/mL a 450 µg/mL e, em seguida, foi adicionado 1 mL da solução de DPPH.

Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução da amostra e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi realizado um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Como padrões foram utilizados a vitamina C (1,6 a 8 µg/mL) e a rutina (2,0 a 12 µg/mL).

Após 30 minutos, a absorbância das soluções foi medida em 518 nm e, em seguida, a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) calculada. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada através da fórmula abaixo:

$$AA\% = \frac{100 - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle}}$$

Foram calculados os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC₅₀) em gráfico, onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, servirá de base para determinação do valor de IC₅₀.

4.7.5.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método utilizado foi adaptado de Kishida *et al.* (1993) e Moraes *et al.* (2006). Esse método envolve a peroxidação da gema de ovo por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malonaldeído (MDA) é um dos principais produtos de decomposição dos hidroxiperoxídeos de ácidos graxos poliinsaturados, formado no decorrer do processo oxidativo (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005). Ao reagir o MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio

acidificado e em condições de elevada temperatura, pode-se mensurar a peroxidação lipídica de matrizes biológicas por meio do cromóforo róseo formado. Para Kishida *et al.* (1993), este é o ensaio mais comum para verificação da peroxidação lipídica.

Foram testadas em cinco repetições as frações e o extrato bruto da espécie *S. westermanii*. Como padrão positivo foi utilizado o antioxidante BHT (butilhidróxidotolueno).

Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo (10% p/v), 0,1 mL de amostra ou padrão 1000 ppm e o volume foi completado com água destilada para 1 mL. Em seguida, foi acrescentado a cada um dos tubos de ensaio 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (ABAP) $0,07 \text{ mol.L}^{-1}$, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% p/v em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1,1% p/v. Os tubos de ensaio foram submetidos ao banho-maria (95°C) por 1 hora, sob agitação.

Após resfriamento, foi acrescentado 5 mL de n-butanol a cada tubo, que foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram submetidos ao espectrofotômetro em 532 nm. O mesmo processo foi realizado com o branco.

A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem, segundo a Equação: $IA (\%) = 1 - (Abs \text{ amostra} / Abs \text{ controle}) \times 100$, sendo, Abs amostra a absorbância da amostra e Abs controle a absorbância do controle totalmente oxidado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA). Para comparações entre as médias dos índices de atividade (IA%), utilizou-se o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Um fluxograma dos procedimentos práticos como determinação de umidade, cinzas totais e ensaio sistemático de análise fitoquímica, bem como ao isolamento e à identificação de compostos químicos estão resumidos na Figura 8.

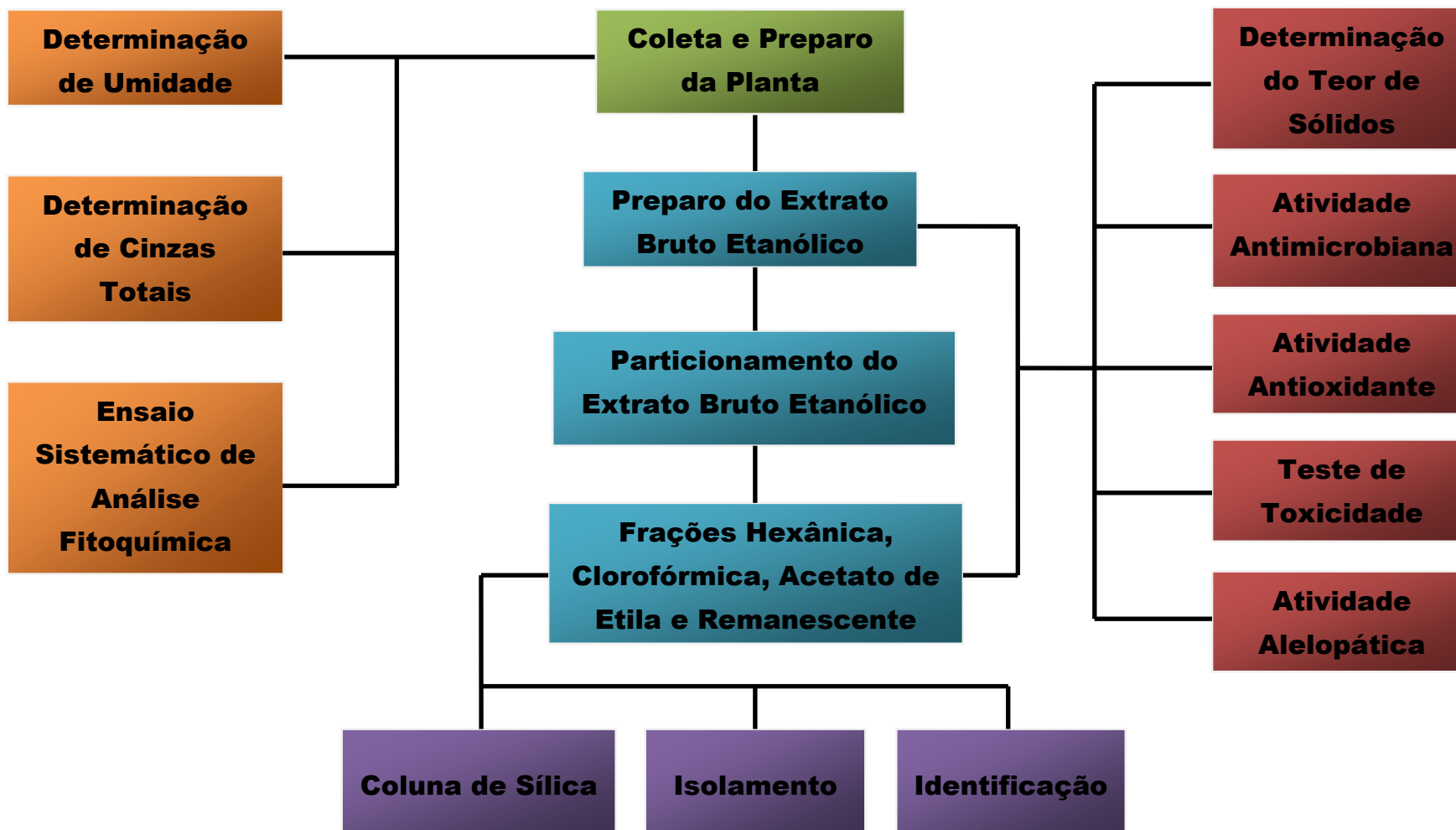


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS EM PARTES AÉREAS DE *S. westermanii* Dusén, ASTERACEAE

FONTE: O autor (2014)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram obtidos mecanicamente 6300 gramas de partes aéreas fragmentadas da espécie *S. westermanii*. O material botânico foi seco a temperatura ambiente e protegido da luz solar por 2 meses. A secagem possui como principal finalidade a interrupção de reações de hidrólise e contaminação microbiana que possam ocorrer com a planta fresca (SIMÕES *et al.*, 2007 p.230).

5.2 UMIDADE E CINZAS TOTAIS

A perda por dessecação das partes aéreas da espécie *S. westermanii* realizadas em estufa apresentou um teor de umidade acima de 14% que é o limite máximo recomendado de umidade para drogas vegetais (BRASIL, 2010).

Na Tabela 2 estão representados os resultados de cinzas totais e umidade.

TABELA 2 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS

| DETERMINAÇÃO | PARTES AÉREAS |
|-------------------|------------------|
| UMIDADE (%) | 15,3335 ± 0,3001 |
| CINZAS TOTAIS (%) | 8,5925 ± 0,3132 |

FONTE: O autor (2014)

5.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO

Para a obtenção do extrato bruto foi empregado o álcool 95% como solvente extrator. A extração foi realizada em aparelho modificado de Soxhlet e concentrado no próprio aparelho e, para melhor redução teor de etanol, foi utilizado banho maria

a 60°C. Após a obtenção do extrato bruto foram realizados testes físico-químicos, que estão presentes na Tabela 3.

TABELA 3 – RESULTADOS OBTIDOS COM O EXTRATO BRUTO

| DETERMINAÇÃO | EXTRATO BRUTO |
|---------------------|---------------|
| pH | 4,6 |
| TEOR DE SÓLIDOS (%) | 5,65 ± 0,0002 |
| COLORAÇÃO | MARROM |

FONTE: O autor (2014)

5.4 ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

5.4.1 Análise sistemática do extrato aquoso 20%

Para o estudo fitoquímico das partes aéreas da espécie *S. westermanii* utilizou-se extrato aquoso. O resultado do ensaio está representado na Tabela 4.

TABELA 4 – RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO 20%

| ANÁLISES | EXTRATO AQUOSO |
|---------------------------|----------------|
| HETEROSÍDEOS ANTOCIÂNICOS | - |
| HETEROSÍDEOS SAPONÍNICOS | + |
| HETEROSÍDEOS CIANOGENÍCOS | - |
| TANINOS HIDROLISÁVEIS | - |
| TANINOS CONDENSADOS | - |
| ÁCIDOS FIXOS | - |
| ÁCIDOS VOLÁTEIS | - |
| AMINOGRUPOS | + |

FONTE: O autor (2014)

5.4.2 Análise sistemática do extrato hidroalcoólico 20%

Para o estudo fitoquímico das partes aéreas da espécie *S. westermanii* utilizou-se extrato hidroalcoólico 20% e das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila e os resultados obtidos estão presentes na Tabela 5.

TABELA 5 – RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 20%

| GRUPOS FITOQUÍMICOS | ANÁLISES | FRAÇÃO HEXANO | FRAÇÃO CLOROFÓRMIO | FRAÇÃO ACETATO DE ETILA | FRAÇÃO REMANESCENTE |
|----------------------------|----------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------|
| ALCALOIDES | Reativo Mayer | - | + | - | - |
| | Reativo Dragendorff | - | + | - | - |
| | Reativo Bouchardat | - | + | - | - |
| FLAVONOIDES | Leucoantocianidinas | - | + | - | - |
| | Heterosídeos | - | - | + | - |
| | Flavônicos | - | - | + | + |
| | Oxálico Bórico | - | - | - | - |
| | Pacheco | - | - | - | - |
| | Zinco em HCl | - | - | - | - |
| CUMARINAS | Tubo | - | - | - | - |
| | Papel | - | - | - | - |
| IRIDOIDES | Floroglucinol | + | - | - | - |
| | Ácido Sulfúrico | - | - | - | - |
| | Ácido Sulfúrico e Vanilina | + | - | - | - |
| ANTRAQUINONAS | Reação Bornträger | - | - | - | - |
| ESTEROIDES/ TRITERPENOS | Reação Liberman-Bouchard | + | - | - | - |
| | Reação Keller-Kelliani | + | - | - | - |

FONTE: O autor (2014)

Na pesquisa de alcaloides verificou-se reação positiva para os reativos de Mayer, Dragendorff e Bouchardat com aparecimento de precipitado de coloração tijolo na fração clorofórmica.

A presença de leucoantocianidinas na planta mostrou-se positiva na fração clorofórmio que é explicada pela redução da leucoantocianidina de coloração

amarela que, em presença de HCl, se reduz à antocianidina de coloração vermelha, produzindo o deslocamento batocrômico da Banda I. Esse mesmo deslocamento ocorreu para heterosídeos flavônicos na fração acetato de etila, com aparecimento de coloração rosa. Desta forma, indicando derivados antociânicos.

No teste de oxálico bórico observa-se a presença de flavonoides na fração acetato de etila e no extrato hidroalcoólico. A reação foi positiva ocorrendo o aparecimento de fluorescência amarela-esverdeada no ultravioleta, sendo indicativo da presença de flavononóis. Essa coloração é explicada pelo deslocamento ipsocrômico da Banda I.

A presença de Iridoides ocorreu na fração hexano com a coloração verde-escura para a reação de floroglucinol e coloração rosa-cereja para a reação de ácido sulfúrico e vanilina.

Para esteroides e/ou triterpenos a reação de Libermann Bouchard indicou a presença de triterpenos na fração hexano. A cor verde nessa fração indica função hidroxila na posição 3 e dupla ligação entre 5 e 6 no anel aromático.

Na reação de Keller-Kelliani a fração hexano obteve resultado positivo com coloração verde indicando a presença de triterpenos.

5.5 PARTIÇÃO DAS FRAÇÕES

A partição líquido-líquido das frações foi realizada em aparelho Soxhlet modificado após obtenção do extrato bruto. Os solventes utilizados para a obtenção das frações foram de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila), até a obtenção da fração hidroalcoólica remanescente.

Na Tabela 6 está representado a quantidade das frações em grama e o rendimento em % em relação à quantidade de planta seca coletada.

TABELA 6 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET

| FRAÇÃO | RENDIMENTO | |
|------------------|------------|--------|
| | g | % |
| HEXANO | 57,9899 | 0,9205 |
| CLOROFÓRMIO | 80,0413 | 1,2705 |
| ACETATO DE ETILA | 3,3672 | 0,0534 |
| REMANESCENTE | 183,6769 | 2,9155 |

FONTE: O autor (2014)

5.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO ISOLADO

5.6.1 Composto FH-39

O composto FH-39 foi isolado da fração hexano das partes aéreas da espécie *S. westermanii* na forma de cristais com formato de agulhas. Para identificação do composto isolado foi utilizado RMN conforme descrito no item 4.6.

No espectro de RMN ^1H (Figura 9) observam-se sinais característicos de hidrogênios olefínicos *trans* em δH 5,15 ppm ($J = 8,2$ e $15,2$ Hz, *dd*) atribuído ao H-22 e δH 5,01 ppm ($J = 8,2$ e $15,2$ Hz, *dd*) atribuído ao H-23 do estigmasterol. Na Figura 10 está representado o DEPT.

A presença do H-3 (multipeto) na região de 3,52 ppm e do hidrogênio olefínico H-6 em δH 5,35 ppm ($J = 5,1$ Hz, *d*) e o acúmulo de sinais na região de 0,60 - 2,40 ppm atribuídos à presença de vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos são sinais característicos dos esteróides β -sitosterol, estigmasterol e campesterol.

Pela análise dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 11) e DEPT podem-se observar entre outros, sinais de carbonos insaturados em δC 140,77 (C), 121,72 (CH), 138,33 (C) e 129,28 (CH).

Baseado nos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C e por comparação destes com os dados encontrados na literatura (ANDRADE, 2003) (Tabela 7) o

isolado FH-39 foi identificado como uma mistura dos esteróides β -sitosterol, estigmasterol e campesterol.

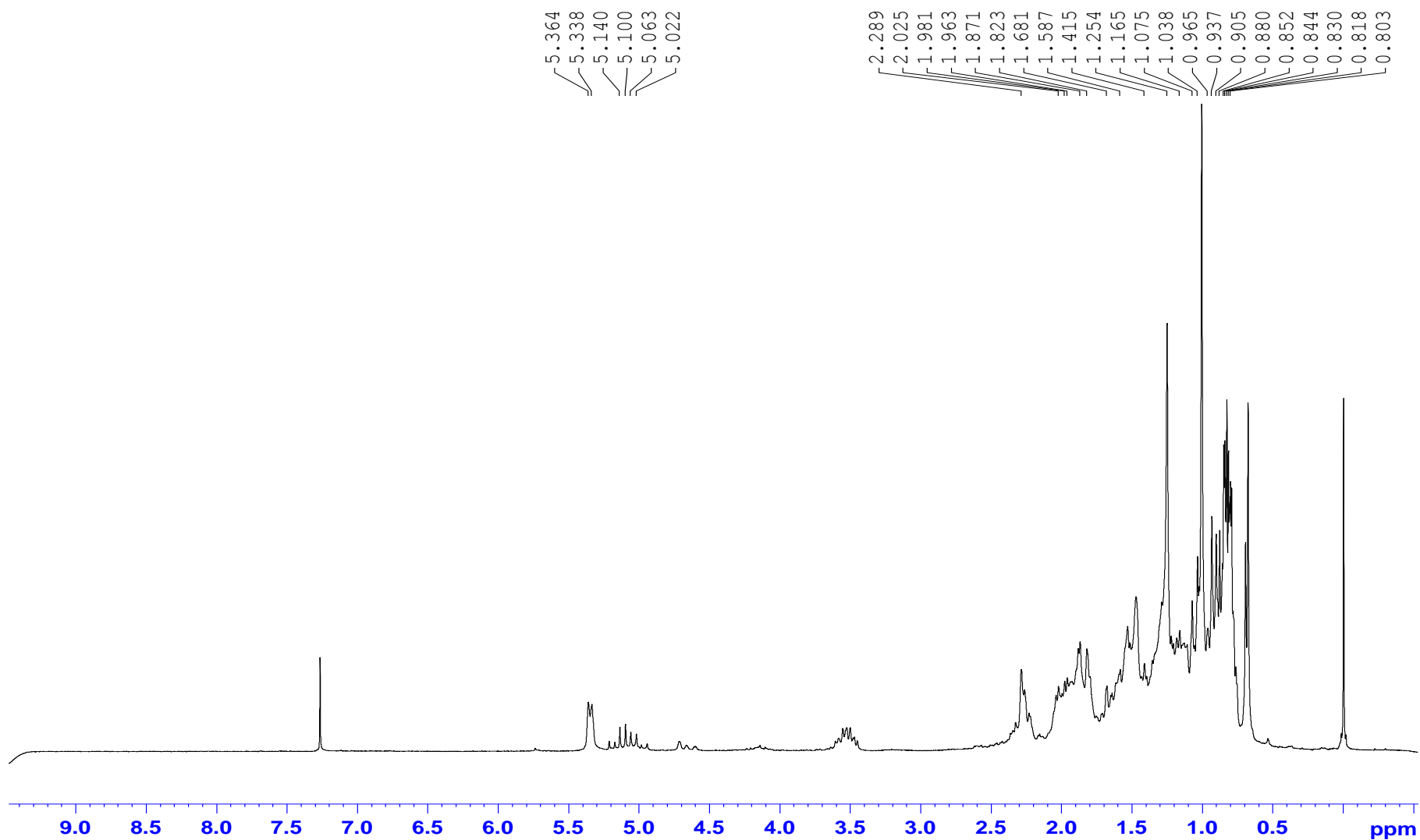


FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN ^1H DO ISOLADO FH-39

FONTE: O autor (2014)

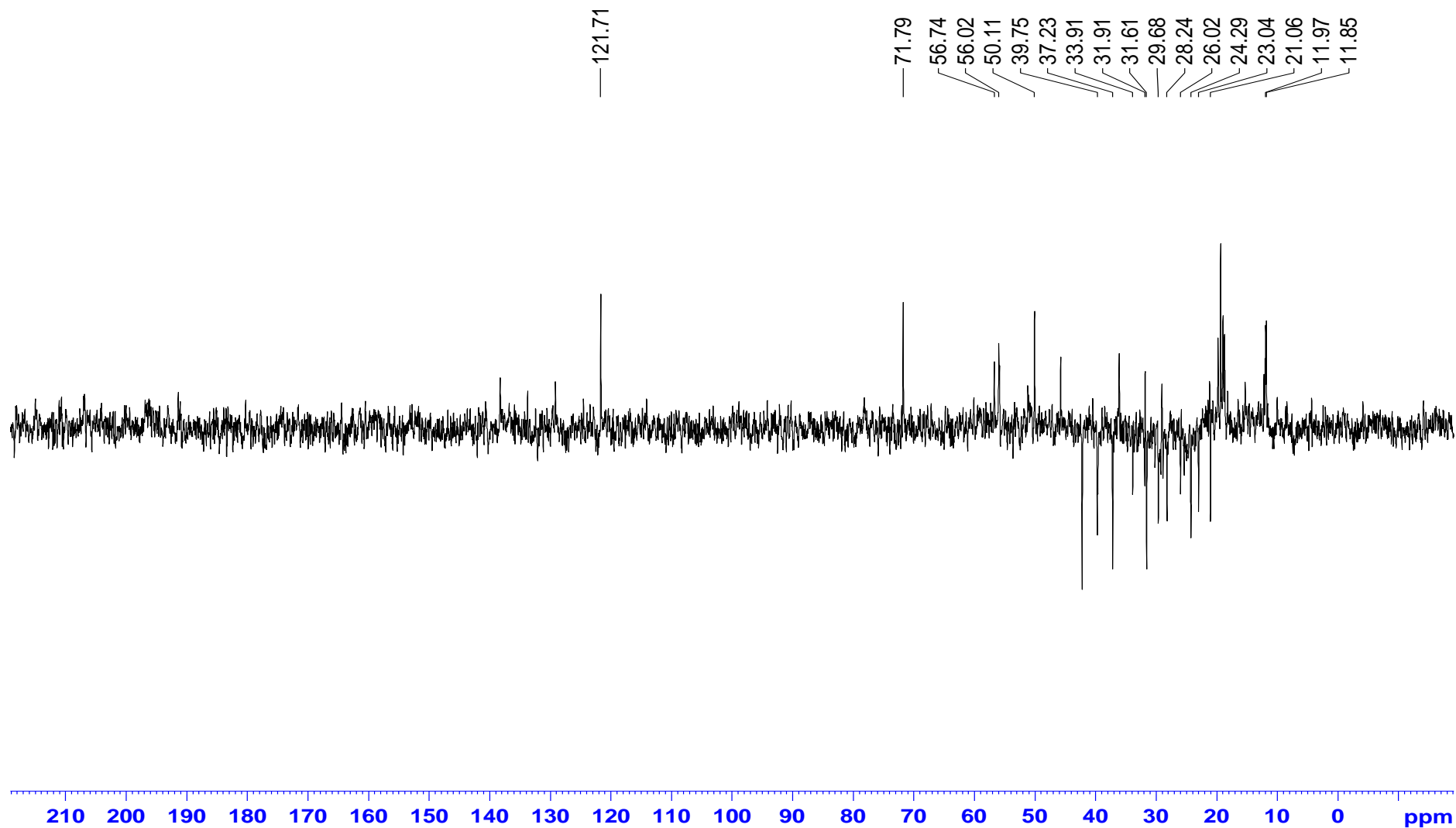


FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN DEPT DO ISOLADO FH-39

FONTE: O autor (2014)

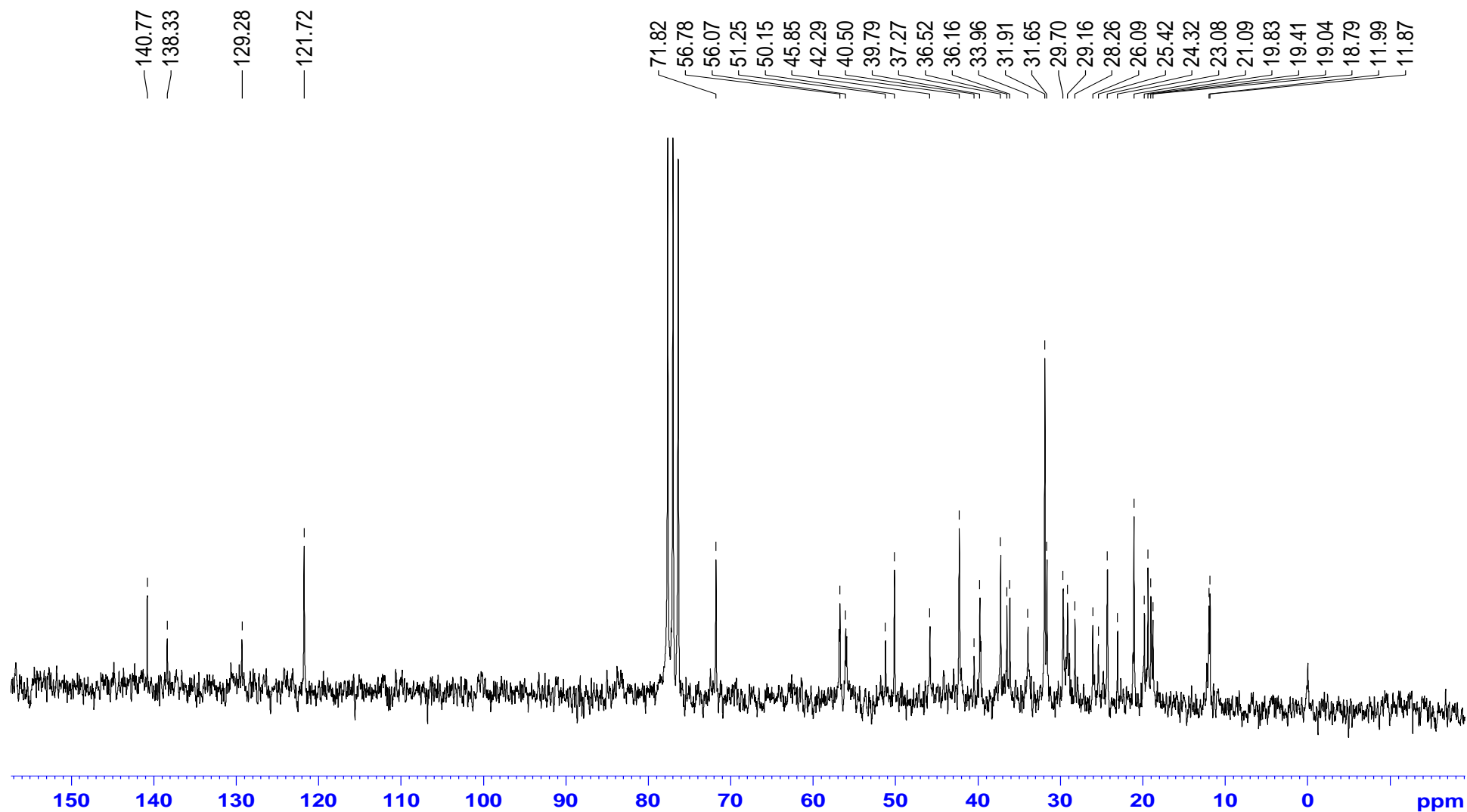


FIGURA 11 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO FH-39

FONTE: O autor (2014)

TABELA 7 – DESLOCAMENTO QUÍMICO NO ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO FH-39

| C | β-sitosterol (ANDRADE, 2003) | Estigmasterol (ANDRADE, 2003) | Campesterol (ANDRADE, 2003) |
|----------|--|--|--|
| 1 | 37,27 | 37,27 | 37,27 |
| 2 | 31,65 | 31,65 | 31,65 |
| 3 | 71,82 | 71,82 | 71,82 |
| 4 | 42,29 | 42,29 | 42,29 |
| 5 | 140,77 | 140,77 | 140,77 |
| 6 | 121,72 | 121,72 | 121,72 |
| 7 | 31,91 | 31,91 | 31,91 |
| 8 | 31,91 | 31,91 | 31,91 |
| 9 | 50,15 | 50,15 | 50,15 |
| 10 | 36,52 | 36,52 | 36,52 |
| 11 | 21,09 | 21,09 | 21,09 |
| 12 | 39,79 | 39,79 | 39,79 |
| 13 | 42,29 | 42,29 | 42,29 |
| 14 | 56,78 | 56,78 | 56,78 |
| 15 | 24,32 | 24,32 | 24,32 |
| 16 | 28,26 | 28,26 | 28,26 |
| 17 | 56,07 | 56,07 | 56,07 |
| 18 | 11,87 | 11,87 | 11,87 |
| 19 | 19,41 | 19,41 | 19,41 |
| 20 | 36,16 | 40,5 | 36,16 |
| 21 | 19,04 | 21,22 | 19,41 |
| 22 | 31,91 | 138,33 | 33,96 |
| 23 | 29,70 | 129,28 | 26,09 |
| 24 | 39,79 | 51,25 | 45,85 |
| 25 | 31,65 | 31,91 | 29,16 |
| 26 | 21,09 | 19,04 | 18,79 |
| 27 | 19,83 | 19,04 | 19,41 |
| 28 | 18,79 | 25,42 | 23,08 |
| 29 | 11,99 | 12,26 | |

FONTE: O autor (2014)

As Figuras 12, 13 e 14 representam as estruturas químicas das substâncias β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, respectivamente.

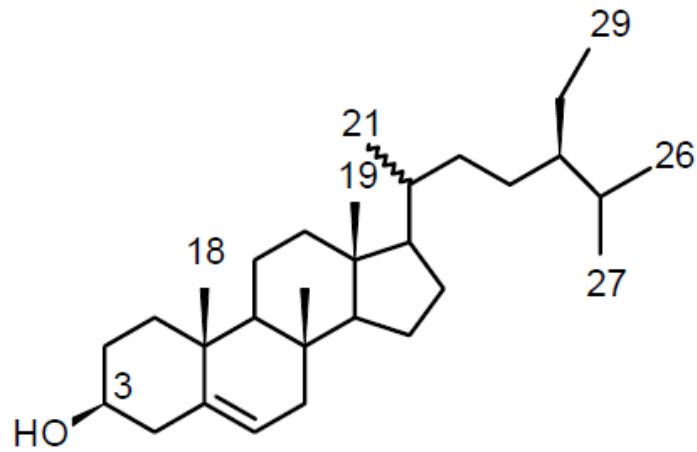
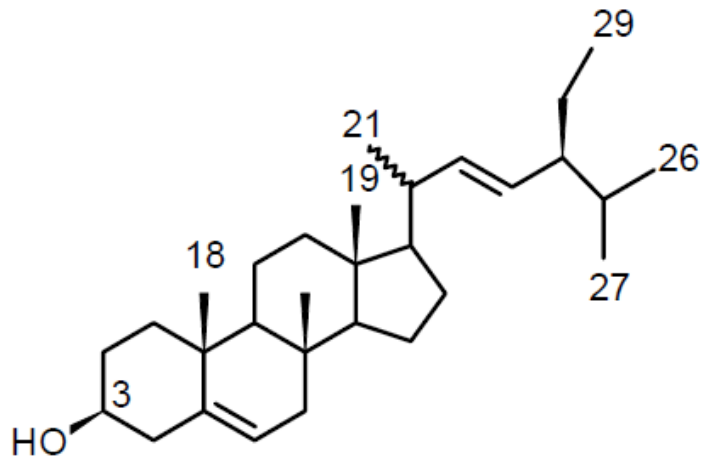
FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DO β -SITOSTEROL

FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTIGMASTEROL

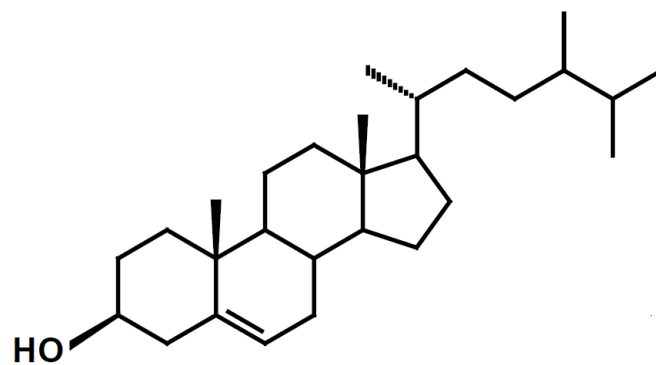


FIGURA 14 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CAMPESTEROL

5.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.7.1 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Para Meyer *et al.* (1982) o microcrustáceo de água salgada *Artemia salina* é utilizado como alimento vivo para peixes e facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários e pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (DL₅₀).

A utilização deste microcrustáceo é explicada por proporcionar uma análise de toxicidade geral (CAVALCANTE *et al.*, 2000), além do baixo custo (MEYER *et al.*, 1982) e simples realização (SIQUEIRA *et al.*, 2001). A aplicação da *Artemia salina* é observada na avaliação de extratos vegetais, metais pesados, resíduos de pesticidas e toxinas fúngicas (KRISHNARAJU *et al.*, 2005).

Na Tabela 8 está relacionado o número dos crustáceos mortos e a DL₅₀ calculada a partir do teste estatístico Probitos.

TABELA 8 – ENSAIO DE MORTALIDADE DE *Artemia salina* e DL₅₀ UTILIZANDO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii*.

| AMOSTRA | MORTALIDADE/CONCENTRAÇÃO (µg/mL) | | | DL ₅₀ (µg/mL) | INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL) |
|----------------------|-------------------------------------|-----|------|-----------------------------|---|
| | 10 | 100 | 1000 | | |
| EXTRATO BRUTO | 1 | 2 | 2 | >1000 | - |
| F. HEXANO | 2 | 1 | 3 | >1000 | - |
| F. CLOROFÓRMIO | 1 | 0 | 2 | >1000 | - |
| F. ACETATO DE ETILA | 0 | 1 | 2 | >1000 | - |
| F. REMANESCENTE | 1 | 2 | 2 | >1000 | - |
| METANOL | 0 | 0 | 0 | >1000 | - |
| SULFATO DE QUINIDINA | 2 | 5 | 10 | 89,41 | 44,06 - 181,46 |

FONTE: O autor (2014)

Segundo Meyer *et al.* (1982), para uma amostra caracterizar-se tóxica frente ao microcrustáceo é necessário que as amostras apresentem valor de DL₅₀ inferior a 1000µg/mL. Desta forma, nenhuma das amostras testadas frente à *Artemia salina* apresentou efeito tóxico, pois o DL₅₀ para cada uma delas foi superior a 1000µg/mL.

Além das amostras, foi realizado teste com o solvente metanol, utilizado para solubilizar as amostras, que não apresentou influência sobre os microcrustáceos.

Apesar da presença de alcaloides na fração clorofórmio (Tabela 5) não houve mortalidade frente à *Artemia salina*. O gênero *Senecio* possui alcaloides pirrolizidínicos que são considerados tóxicos frente a animais herbívoros de grande porte como, por exemplo, bovinos e equinos (HABERMEHL *et al.*, 1988, *apud* SILVA; BOLZAN; HEINZMANN, 2006).

Porém, essa ação tóxica ocorre quando espécies do gênero que possuem esses alcaloides são ingeridas e metabolizadas pelo fígado, que são biotransformadas em metabólitos que se tornam tóxicos a esses animais (VILLARROEL *et al.*, 1997).

5.7.2 Atividade hemolítica

Na atividade hemolítica observa-se que o extrato bruto e as frações hexano e clorofórmio possuem uma resposta dose dependente. Porém para as frações acetato de etila e remanescente ocorreu o contrário, sendo as concentrações maiores com menor porcentagem de hemólise. Na Tabela 9 observa-se que na fração hexano nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL ocorreu a maior porcentagem de hemólise em comparação ao controle.

TABELA 9 – ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL) | % HEMÓLISE | CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT* | | | | |
|---------------------|---------------------------------|------------|--|----|----|----|----|
| EXTRATO BRUTO | 100 | 0.000 | a1 | | | | |
| | 200 | 3.006 | a1 | | | | |
| | 500 | 11.785 | a1 | | | | |
| | 1000 | 21.894 | | a2 | | | |
| F. HEXANO | 100 | 1.038 | a1 | | | | |
| | 200 | 11.865 | a1 | | | | |
| | 500 | 40.303 | | | a3 | | |
| | 1000 | 80.553 | | | | a4 | |
| F. CLOROFÓRMIO | 100 | 1.782 | a1 | | | | |
| | 200 | 2.394 | a1 | | | | |
| | 500 | 16.414 | | a2 | | | |
| | 1000 | 25.751 | | a2 | | | |
| F. ACETATO DE ETILA | 100 | 10.721 | a1 | | | | |
| | 200 | 5.480 | a1 | | | | |
| | 500 | 0.000 | a1 | | | | |
| | 1000 | 0.000 | a1 | | | | |
| F. REMANESCENTE | 100 | 11.040 | a1 | | | | |
| | 200 | 6.172 | a1 | | | | |
| | 500 | 2.926 | a1 | | | | |
| | 1000 | 0.000 | a1 | | | | |
| CONTROLE | - | 100 | | | | | a5 |

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

No Gráfico 1 pode-se visualizar a porcentagem de hemólise.

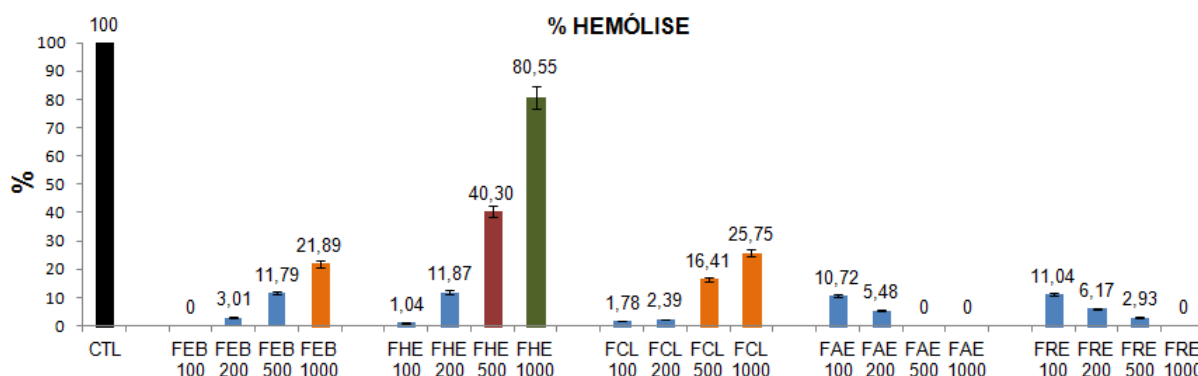


GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* A O CONTROLE HEMÓLISE TOTAL

NOTA: (1) CTL (Controle); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

(2) BARRAS COM A MESMA COR NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2014)

De acordo com Dewick (2002) a toxicidade de alguns componentes naturais são esclarecidas. Alguns alcalóides mesmo que em pequenas quantidades são naturalmente tóxicos. Ainda, segundo Silva (1999) e Monteiro *et al.* (2005), os taninos possuem a capacidade de interagir com macromoléculas, como por exemplo, as proteínas de membrana das hemácias, conferindo um certo grau de toxicidade.

Segundo Dewick (2002) e Karabaliev e Kochev (2003) algumas saponinas triterpênicas possuem a capacidade de causarem hemólise, devido a capacidade desses componentes naturais interagirem com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente com as moléculas de colesterol, induzindo uma deformação na membrana com conseqüente extravasamento do conteúdo intracelular.

5.7.3 Avaliação da atividade antibacteriana

Para Rios, Recio e Villar (1988) a determinação da CIM é considerada a melhor metodologia para avaliar a suscetibilidade ou resistência de bactérias a antimicrobianos.

Na avaliação da concentração inibitória mínima para o extrato bruto e frações da espécie *S. westermanii*, observa-se que não houve resultado significativo das amostras frente aos microrganismos estudados. A atividade do extrato bruto e das frações variou de fraca (500-1000 µg/mL) a inativa (>1000 µg/mL). Os resultados do teste podem ser observados na Tabela 10.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii*

| AMOSTRA | MICRORGANISMO | | | | |
|-----------------|------------------|----------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>K. pneumoniae</i> |
| EXTRATO BRUTO | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL | 1000 µg/µL | >1000 µg/µL |
| F. HEXANO | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL |
| F. CLOROFORMIO | 1000 µg/µL | 1000 µg/µL | 1000 µg/µL | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL |
| F. A. DE ETILA | 1000 µg/µL | 1000 µg/µL | 1000 µg/µL | 1000 µg/µL | 1000 µg/µL |
| F. REMANESCENTE | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL | >1000 µg/µL |

NOTA: CIM: <100 µg/mL – bom potencial inibitório; CIM: 100-500 µg/mL – moderada atividade inibitória; CIM: 500-1000 µg/mL – fraca atividade inibitória; CIM: >1000 µg/mL – inativos

FONTE: O autor (2014)

5.7.4 Estudo da atividade alelopática

A alelopátia está relacionada à capacidade de um vegetal interferir de forma natural no desenvolvimento de outras plantas, por meio de substâncias químicas denominadas aleloquímicos, que são liberados na atmosfera e/ou solo por

volatilização, lixiviação, exsudação radicular e decomposição dos resíduos da planta (RODRIGUES; PASSINI; FERREIRA, 1999).

Algumas espécies da família Asteraceae mostraram-se com potencial para a atividade alelopática, algumas espécies a serem citadas são a *Helianthella quinquenevis* (CATAÑEDA *et al.*, 1996), *Piqueria trinervia* (ANAYA *et al.*, 1996), *Arctium minus* BERNH (BELINELO *et al.*, 2008), *Artemisia annua* L. (MAGIERO, 2009), *Mikania laevigata* (BARATTO *et al.*, 2008), *Baccharis dracunculifolia* (GUSMAN; BITTENCOURT; VESTENA, 2009), *Baccharis trimera* (Less) D.C. e *Achillea millefolium* (GAZIRI; CARVALHO, 2009), *Bidens pilosa* e *Bidens alba* (LIMA *et al.*, 2011), *Emilia Sonchifolia* (L.) DC. (CARMINATE, 2011), *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (OLIVEIRA *et al.*, 2011), *Conyza bonariensis* (PICCININI *et al.*, 2012), *Heterothalamus psiadioides* Less e *Heterothalamus alienus* (Spreng) (SILVA, 2012).

Além da família o gênero também mostrou-se alelopaticamente ativo como a espécie *Senecio jacobaea* L. (AHMED; WARDLE, 1994) e *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less (CRUZ-SILVA; SANTORUM e BINI, 2009). Ao contrário das espécies citadas, a espécie *Senecio vulgaris* L. (QASE; HIL, 1989) não apresentou nenhuma atividade alelopática.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade alelopática do extrato bruto etanólico e das frações obtidas das partes aéreas de *S. westermanii* em influenciar a germinação, crescimento, respiração das raízes e o teor de fotossíntese.

5.7.4.1 Germinação

As frações hexano e clorofórmio influenciaram no IVG das sementes de *L. sativa*, pois diferenciaram estatisticamente do controle. As concentrações de 500 e 1000 µg/mL de ambas as frações influenciaram de forma negativa a germinação dessas sementes. O resultado do ensaio pode ser visto na Tabela 11.

TABELA 11 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *L. sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL) | IVG (ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO) | CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT* | |
|---------------------|---------------------------------|--|--|----|
| EXTRATO BRUTO | 250 | 47.633 | | a2 |
| | 500 | 47.417 | | a2 |
| | 1000 | 46.979 | | a2 |
| F. HEXANO | 250 | 47.333 | | a2 |
| | 500 | 45.029 | a1 | |
| | 1000 | 43.662 | a1 | |
| F. CLOROFÓRMIO | 250 | 47.396 | | a2 |
| | 500 | 44.016 | a1 | |
| | 1000 | 45.683 | a1 | |
| F. ACETATO DE ETILA | 250 | 48.583 | | a2 |
| | 500 | 46.708 | | a2 |
| | 1000 | 47.321 | | a2 |
| F. REMANESCENTE | 250 | 48.467 | | a2 |
| | 500 | 48.271 | | a2 |
| | 1000 | 47.833 | | a2 |
| CONTROLE | - | 48.937 | | a2 |

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

A influência na germinação das sementes pode ser relatada por Yamauti, Barroso e Alves (2010), que explicam os possíveis efeitos alelopáticos da parte aérea da planta, além da confirmação por Economou *et.al.* (2002) que relataram a inibição no crescimento de mudas de aveia, principalmente com extratos da parte aérea.

Além disso, segundo Ferreira e Áquila (2000) e Maraschin-Silva e Áquila (2006) as alterações na germinação podem ser resultantes de alterações na permeabilidade de membranas, no funcionamento de mensageiros secundários, na respiração devido ao seqüestro de oxigênio, na conformação de enzimas e receptores e na transcrição e tradução do DNA.

Segundo Henriques *et al.* (2003) os alcaloides presentes na fração clorofórmio (Tabela 5) são compostos secundários que atuam na regulação do

crescimento, provavelmente inibindo a germinação, este fato ocorre devido ao seu poder quelante e/ou citotóxico.

De acordo com Rizvi e Rizvi (1992) os esteróides hidrofóbicos (Tabela 5) ligam-se as membranas celulares, devido à propriedade detergente e, conseqüentemente, afetando o funcionamento celular e seu crescimento.

O Gráfico 2 expõe os resultados de uma forma mais simplificada do IVG.

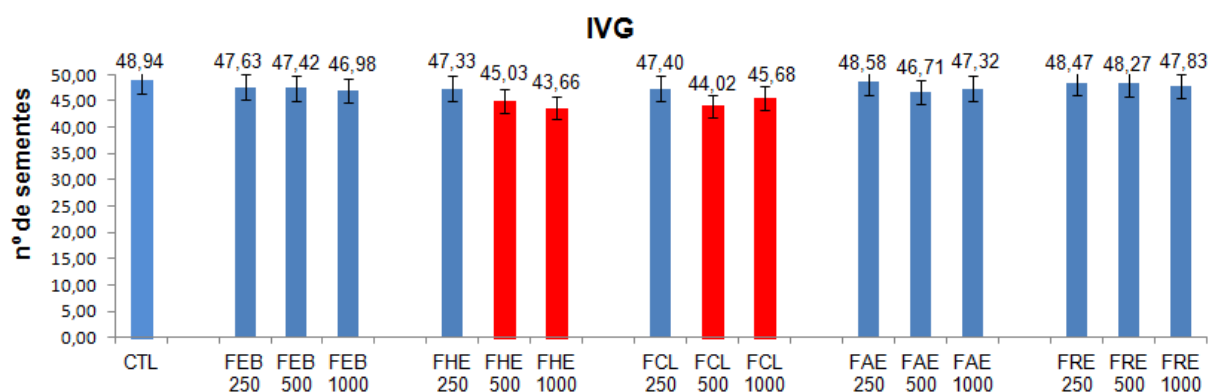


GRÁFICO 2 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE *L. sativa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii*

NOTA: (1) CTL (Controle); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

(2) BARRAS COM A MESMA COR NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2014)

5.7.4.2 Crescimento

No crescimento radicular, envolvendo a radícula e o hipocótilo, apenas algumas frações foram semelhantes ao controle. As frações hexano (250 e 500 µg/mL), acetato de etila (250 µg/mL) e remanescente (250 µg/mL) não influenciaram o crescimento da radícula nas sementes de *L. sativa*, pois não diferenciaram estatisticamente do controle. Enquanto todas as concentrações do extrato bruto e da fração clorofórmio foram estatisticamente diferentes do controle. Na Tabela 12 estão representados os resultados do ensaio.

TABELA 12 – ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL) | RADÍCULA (mm) | HIPOCÓTILO (mm) |
|---------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|
| EXTRATO BRUTO | 250 | 30.500 a1 | 5.975 a1 |
| | 500 | 31.750 a1 | 5.700 a1 |
| | 1000 | 29.175 a1 | 5.625 a1 |
| F. HEXANO | 250 | 36.550 a2 | 5.500 a1 |
| | 500 | 34.050 a2 | 5.350 a1 |
| | 1000 | 31.200 a1 | 5.550 a1 |
| F. CLOROFÓRMIO | 250 | 31.800 a1 | 5.525 a1 |
| | 500 | 29.925 a1 | 5.475 a1 |
| | 1000 | 28.725 a1 | 5.275 a1 |
| F. ACETATO DE ETILA | 250 | 34.125 a2 | 6.225 a1 |
| | 500 | 31.250 a1 | 5.925 a1 |
| | 1000 | 31.225 a1 | 6.000 a1 |
| F. REMANESCENTE | 250 | 33.650 a2 | 5.750 a1 |
| | 500 | 30.275 a1 | 6.075 a1 |
| | 1000 | 32.600 a1 | 5.200 a1 |
| CONTROLE | - | 38.200 a2 | 7.250 a2 |

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Segundo Hoffmann *et al.* (2007) o sistema radicular é mais sensível à ação dos aleloquímicos do que a parte aérea. Esse fato deve-se ao maior tempo das raízes em contato direto e prolongado com o extrato e frações em relação à outras estruturas, afetando o desenvolvimento da raiz (CHUNG; AHN; YUN, 2001)

Ainda em relação ao crescimento inicial, Gatti, Perez e Lima (2004), Periotto, Perez e Lima (2004), Maraschin-Silva e Áquila (2006) e Borella e Pastorini (2009) afirmam que as substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, bem como disparidades no tamanho estrutural das plântulas, além de raízes primárias atrofiadas e defeituosas, assim como a ausência de raízes secundárias e necrose radicular.

Para uma melhor visualização dos resultados do comprimento da radícula e hipocótilo, pode-se analisar os Gráficos 3 e 4, respectivamente.

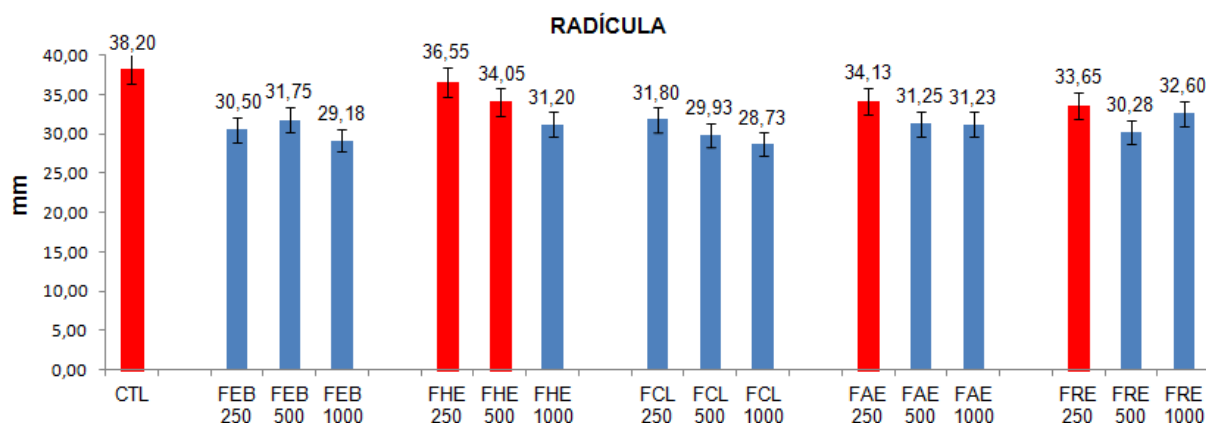


GRÁFICO 3 – COMPRIMENTO DA RADÍCULA DAS SEMENTES DE *L. sativa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* COMPARADAS AO CONTROLE ÁGUA

NOTA: (1) CTL (Controle); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

(2) BARRAS COM A MESMA COR NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2014)

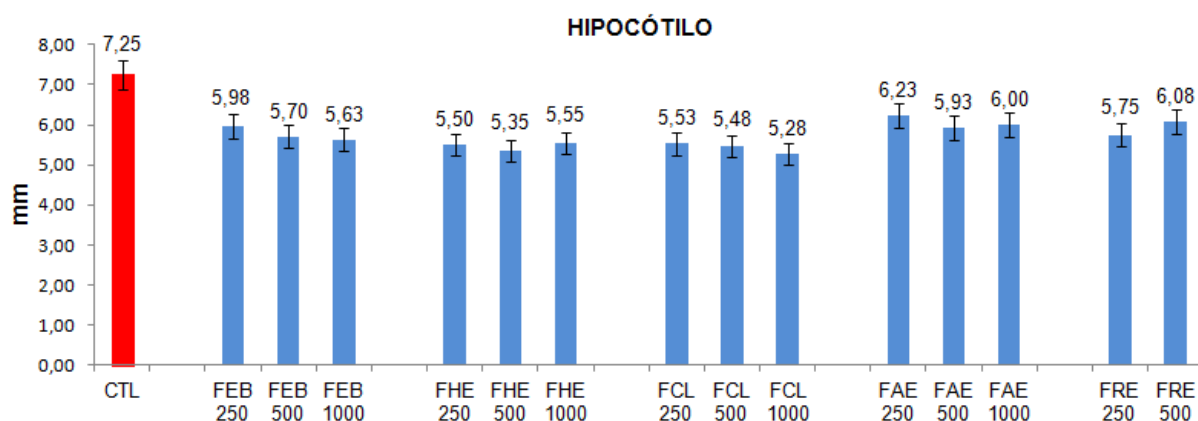


GRÁFICO 4 – COMPRIMENTO DO HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE *L. sativa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* COMPARADAS AO CONTROLE ÁGUA

NOTA: (1) CTL (Controle); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

(2) BARRAS COM A MESMA COR NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2014)

5.7.4.3 Respiração das raízes

Na respiração das raízes apenas a fração remanescente nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL não influenciaram na respiração celular das raízes de *L. sativa*, pois os valores das absorbâncias não diferenciaram estatisticamente da absorbância do controle. Porém as outras frações e o extrato bruto apresentaram valores de absorbância estatisticamente diferentes do controle, mas a fração clorofórmio nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL e a fração acetato de etila na concentração de 500 µg/mL foram às frações que mais diferenciaram do controle água. Na Tabela 13 estão representados os resultados do ensaio.

TABELA 13 – ENSAIO DE RESPIRAÇÃO DAS RAÍZES DE *L. sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL) | ABSORBÂNCIA (530 nm) | CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT* | | | | | |
|---------------------|---------------------------------|----------------------|--|----|----|----|----|----|
| EXTRATO BRUTO | 250 | 0.234 | | | | | a5 | |
| | 500 | 0.229 | | | | | a5 | |
| | 1000 | 0.141 | | | a3 | | | |
| F. HEXANO | 250 | 0.185 | | | | a4 | | |
| | 500 | 0.139 | | | a3 | | | |
| | 1000 | 0.110 | | a2 | | | | |
| F. CLOROFÓRMIO | 250 | 0.141 | | | a3 | | | |
| | 500 | 0.047 | a1 | | | | | |
| | 1000 | 0.048 | a1 | | | | | |
| F. ACETATO DE ETILA | 250 | 0.167 | | | a3 | | | |
| | 500 | 0.072 | a1 | | | | | |
| | 1000 | 0.152 | | | a3 | | | |
| F. REMANESCENTE | 250 | 0.107 | | a2 | | | | |
| | 500 | 0.267 | | | | | | a6 |
| | 1000 | 0.254 | | | | | | a6 |
| CONTROLE | - | 0.278 | | | | | | a6 |

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

Segundo Rice (1984), Almeida (1988) e Pires *et al.* (2001) os aleloquímicos interferem não somente na germinação e crescimento das plantas, mas em atividades vitais, como na respiração, na fotossíntese, nas atividades enzimáticas, na permeabilidade da membrana, na assimilação de nutrientes e em síntese de proteínas.

No Gráfico 5 pode-se observar o resultado dos valores das absorbâncias para a respiração das raízes.

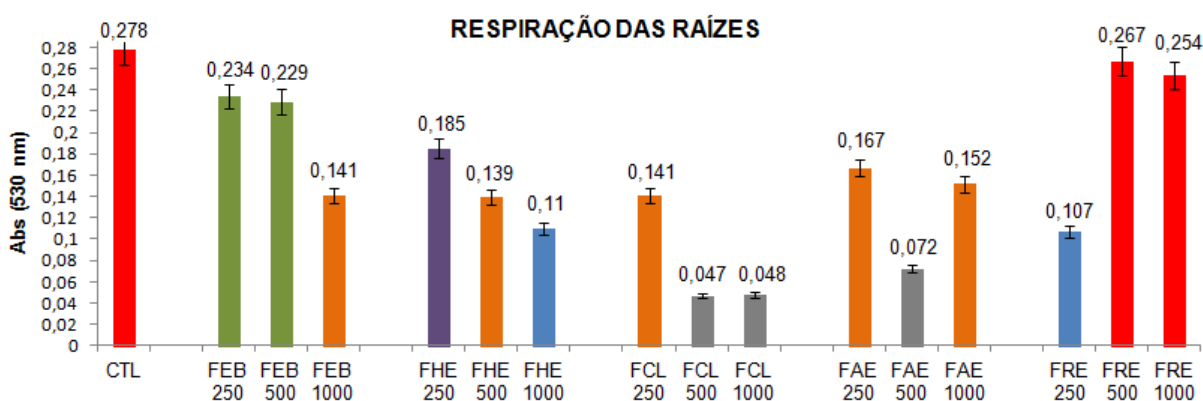


GRÁFICO 5 – COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS DO ENSAIO DE RESPIRAÇÃO DAS RAÍZES DAS SEMENTES *L. sativa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* COMPARADAS AO CONTROLE ÁGUA

NOTA: (1) CTL (Controle); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

(2) BARRAS COM A MESMA COR NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2014)

5.7.4.4 Fotossíntese

No ensaio de fotossíntese nenhum valor de clorofila total foi estatisticamente diferente ao do controle. Dessa forma, todas as frações e o extrato bruto nas três concentrações estudadas não alteraram o padrão de fotossíntese das sementes de *L. sativa*. Os valores do ensaio estão representados na Tabela 14.

TABELA 14 – ENSAIO DE FOTOSSÍNTESE DAS PLÂNTULAS DE *L. sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL) | CLOROFILA TOTAL | CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT* |
|---------------------|---------------------------------|-----------------|--|
| EXTRATO BRUTO | 250 | 9.392 | a1 |
| | 500 | 9.201 | a1 |
| | 1000 | 9.066 | a1 |
| F. HEXANO | 250 | 7.960 | a1 |
| | 500 | 8.177 | a1 |
| | 1000 | 8.496 | a1 |
| F. CLOROFÓRMIO | 250 | 8.816 | a1 |
| | 500 | 9.103 | a1 |
| | 1000 | 8.862 | a1 |
| F. ACETATO DE ETILA | 250 | 10.028 | a1 |
| | 500 | 8.877 | a1 |
| | 1000 | 10.379 | a1 |
| F. REMANESCENTE | 250 | 9.504 | a1 |
| | 500 | 10.131 | a1 |
| | 1000 | 9.471 | a1 |
| CONTROLE | - | 8.716 | a1 |

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

Clorofila total: (absorbância da clorofila **a** x 20,2) + (absorbância da clorofila **b** x 8,02)

FONTE: O autor (2014)

De acordo com Rizvi *et al.* (1992) os polifenóis, as cumarinas, ácidos fenólicos e os flavonoides são alguns dos metabólitos secundários que atuam como fitossanitários inibitórios capazes de atuarem no processo de fotossíntese de outras plantas, alterando o transporte de elétrons e a fosforilação do sistema fotossintético.

Segundo Carmo, Borges e Takaki (2007) *apud* Einhelling e Kuan (1971), Baziramakenga et al. (1994) e Chou (1999) dizem que as alterações no conteúdo de clorofila das plantas receptoras inibem a fotossíntese. Além disso, a inibição da formação das Mg-porfirinas é um sintoma da degradação das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese (CARMO; BORGES; TAKAKI, 2007 *apud* EINHELLIG, 1986).

Porém para a espécie *S. westermanii* sobre as sementes de *L. sativa* isso não ocorreu, pois não houve diferença entre o controle e as amostras estudadas. O Gráfico 6 apresenta os valores referentes a fotossíntese total das plântulas.

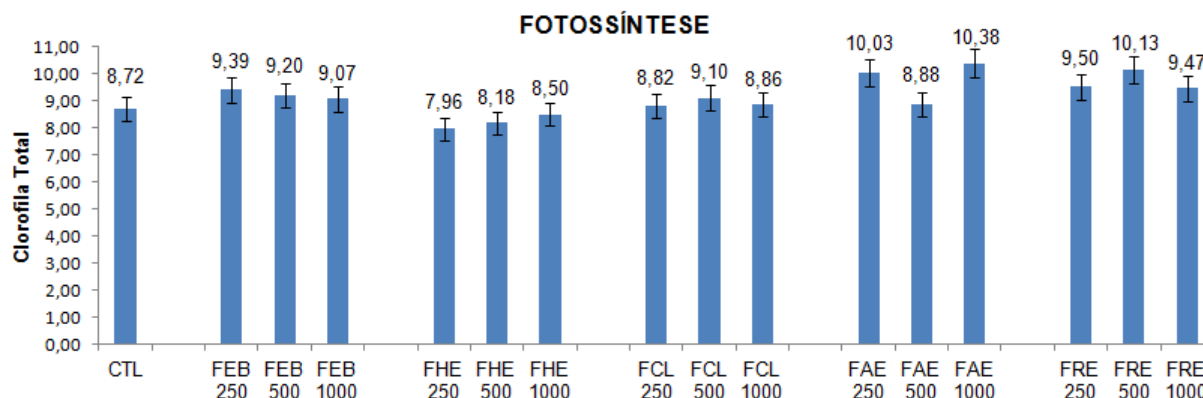


GRÁFICO 6 – COMPARAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE TOTAL DAS PLÂNTULAS DAS SEMENTES *L. sativa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* COMPARADAS AO CONTROLE ÁGUA

NOTA: (1) CTL (Controle); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

(2) BARRAS COM A MESMA COR NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2014)

5.7.5 Atividade antioxidante

5.7.5.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

A atividade antioxidante de cada amostra (extrato bruto, frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente) foi calculada em relação aos padrões vitamina C e rutina, cujas atividades foram consideradas 100%. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

| AMOSTRA | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À RUTINA AA (%) \pm DP | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VITAMINA C AA (%) \pm DP |
|------------|--|--|
| VITAMINA C | - | 100 a4 |
| RUTINA | 100 a1 | - |
| EB | 24,33 \pm 0,023 a3 | 8,70 \pm 0,023 a7 |
| FH | 64,44 \pm 0,035 a2 | 23,04 \pm 0,035 a6 |
| FCL | 92,51 \pm 0,041 a1 | 33,08 \pm 0,041 a5 |
| FAE | 53,74 \pm 0,022 a2 | 19,22 \pm 0,022 a6 |
| FHR | 20,05 \pm 0,024 a3 | 7,17 \pm 0,024 a7 |

FONTE: O autor (2014)

A partir dos resultados obtidos do extrato bruto e frações de *S. westermanii*, conclui-se que todas as amostras apresentam atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio. Considerando as atividades da rutina e da vitamina C como referências, pode-se observar que a fração clorofórmio (33,08%) apresentou a maior atividade antioxidante em relação à rutina, seguida das frações hexano (23,04%) e acetato de etila (19,22%), respectivamente. Porém, quando as amostras são comparadas ao padrão vitamina C, apesar de existir atividade antioxidante, mas não superior a 33%, que ocorre com a fração clorofórmio.

Os Gráficos 7 e 8 apresentam os resultados do ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, onde as barras pretas são os padrões e as azuis são as amostras de *S. westermanii*.

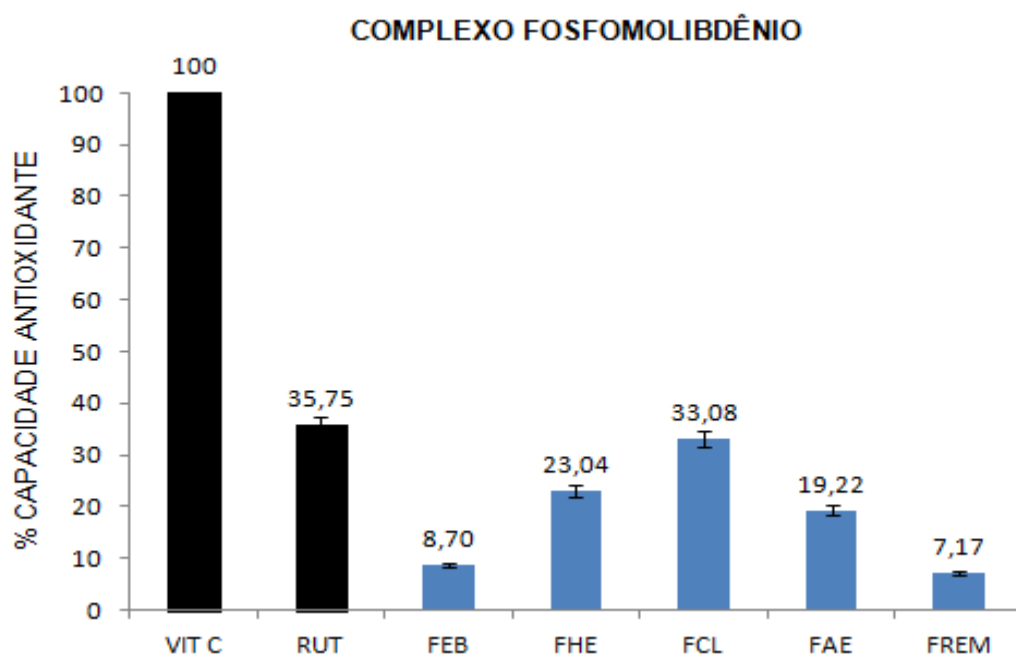


GRÁFICO 7 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A VITAMINA C

NOTA: VIT C (Vitamina C); RUT (Rutina); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

FONTE: O autor (2014)

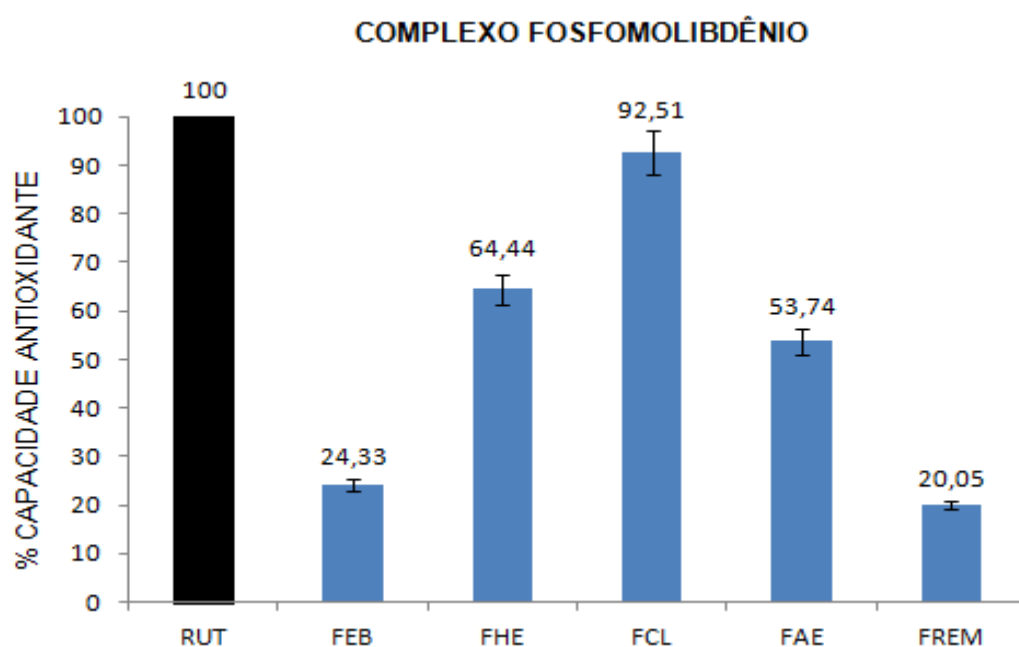


GRÁFICO 8 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A RUTINA

NOTA: RUT (Rutina); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

FONTE: O autor (2014)

5.7.5.2 Redução do radical DPPH

Para a avaliação dos resultados desta análise foram calculados a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC_{50} , que é a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. As amostras foram comparadas com os padrões vitamina C e rutina.

Os Gráficos 9 à 15, apresentam os 5 pontos das concentrações utilizadas para cada amostra com sua respectiva porcentagem de atividade antioxidante do radical DPPH. Através dos pontos foram adicionados a linha de tendência e a equação da reta para os padrões e amostras para o cálculo do IC_{50} .

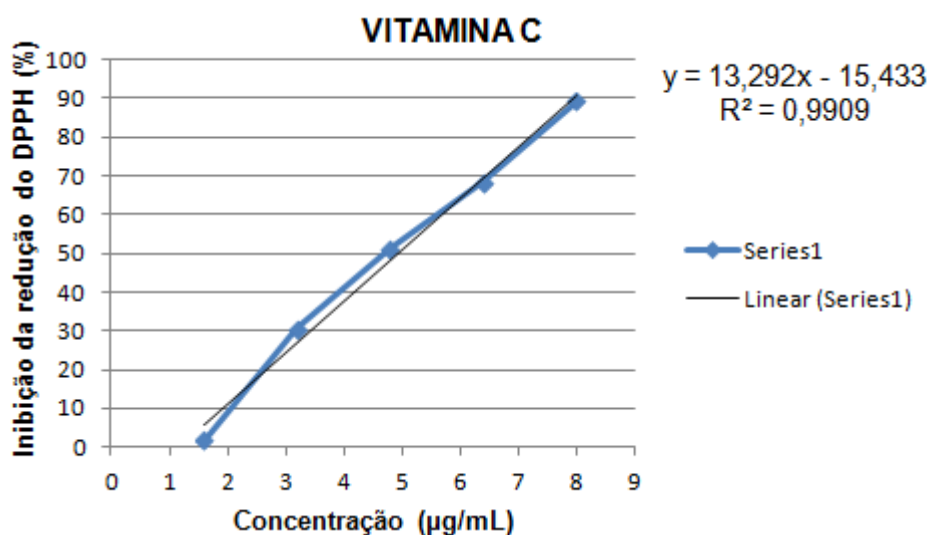


GRÁFICO 9 – CURVA PADRÃO DA VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH

FONTE: O autor (2014)

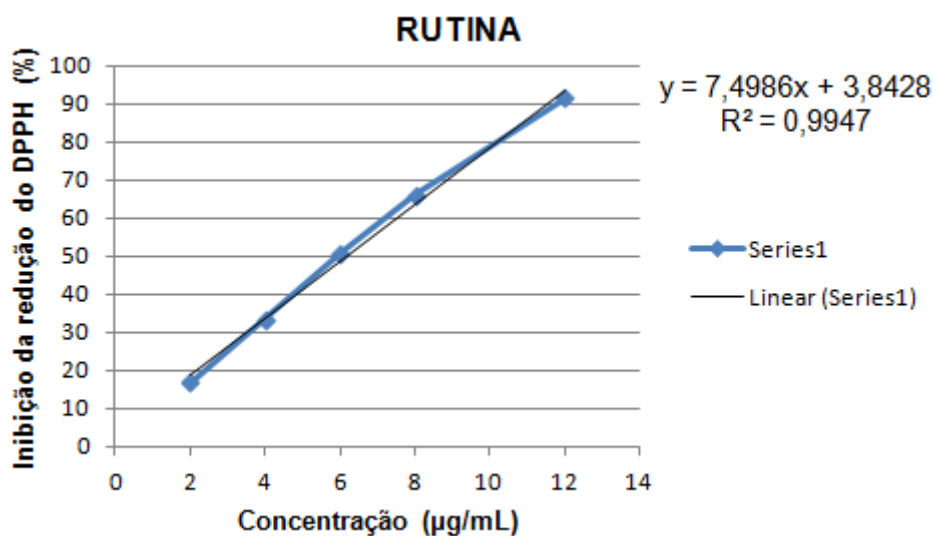


GRÁFICO 10 – CURVA PADRÃO DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2014)

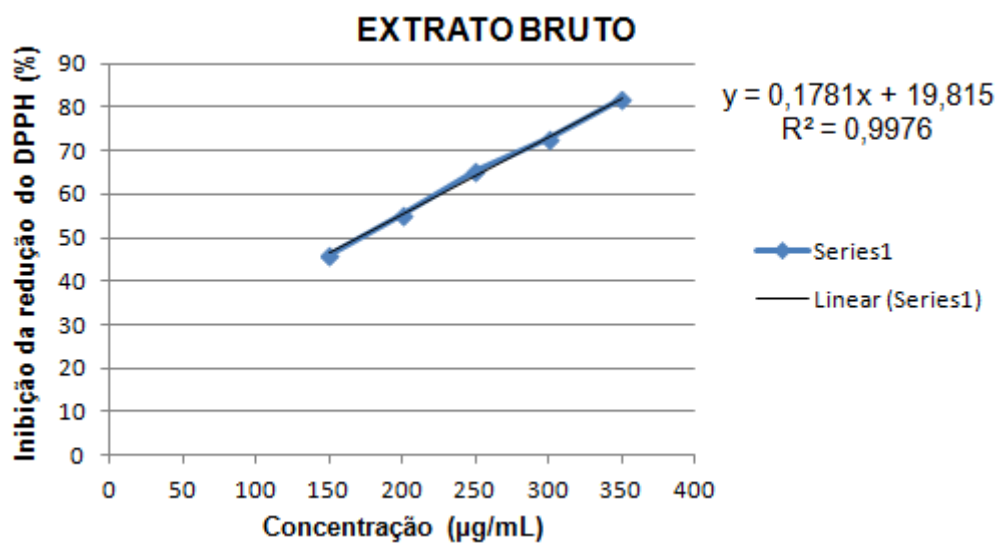


GRÁFICO 11 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *S. westermanii* DO EXTRATO BRUTO PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2014)

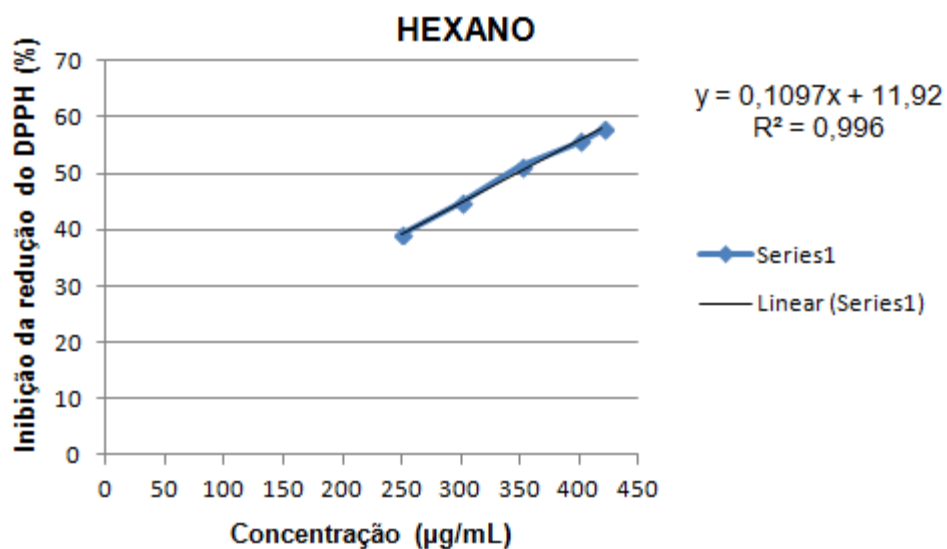


GRÁFICO 12 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *S. westermanii* DA FRAÇÃO HEXANO PELA REDUÇÃO DO DPPH

FONTE: O autor (2014)

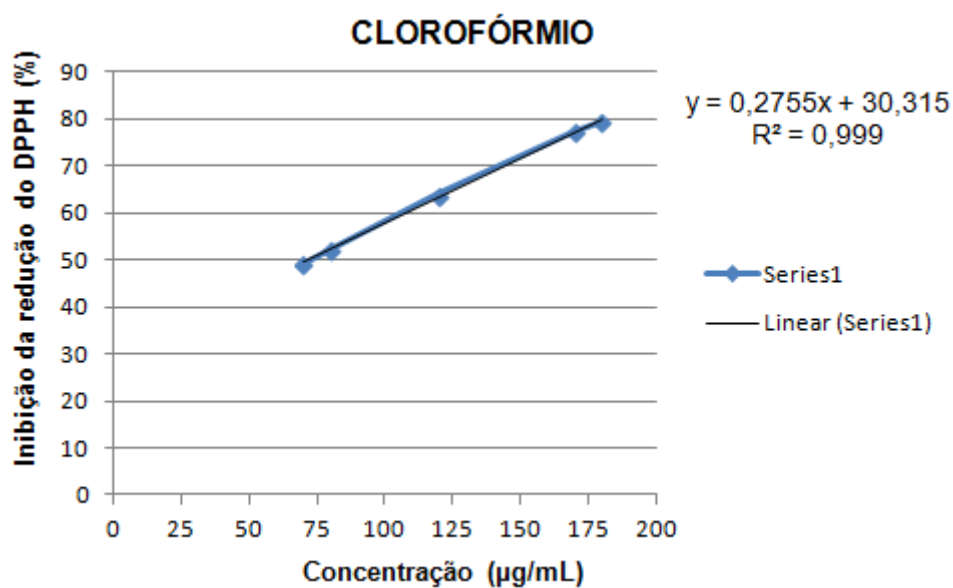


GRÁFICO 13 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *S. westermanii* DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO PELA REDUÇÃO DO DPPH

FONTE: O autor (2014)

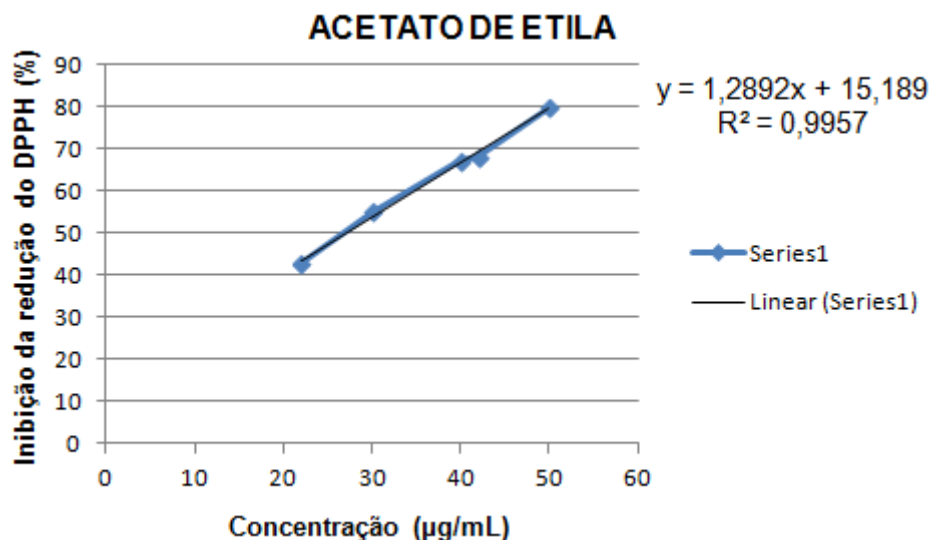


GRÁFICO 14 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *S. westermanii* DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PELA REDUÇÃO DO DPPH

FONTE: O autor (2014)

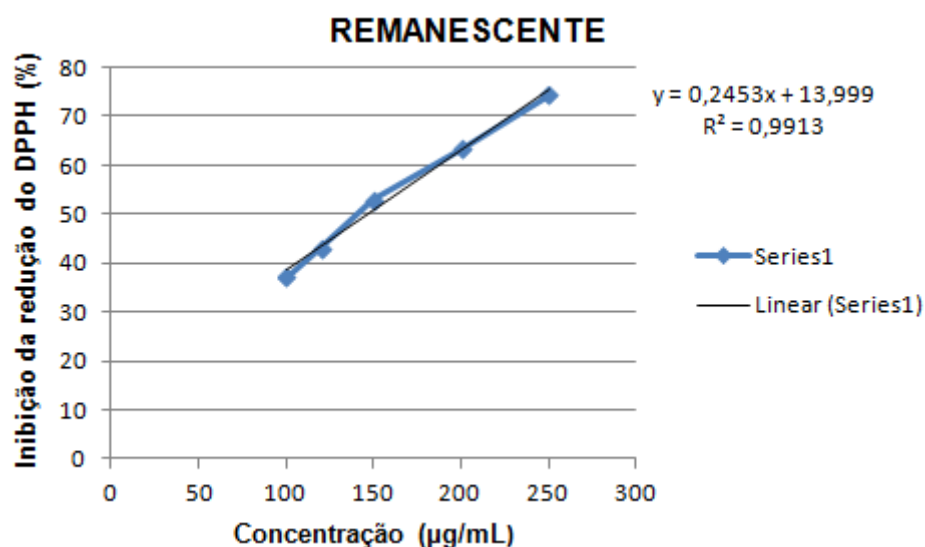


GRÁFICO 15 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *S. westermanii* DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE PELA REDUÇÃO DO DPPH

FONTE: O autor (2014)

Para verificação da diferença estatística entre as amostras aplicou-se análise de variância – ANAVA e para localização das diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados de IC_{50} estão representados na Tabela 16, e correspondem às médias de três repetições e o desvio padrão.

As amostras foram comparadas posteriormente com os padrões de vitamina C e rutina, e chegou-se em 6 grupos que se diferem entre si das 5 amostras

analisadas. A fração acetato de etila foi a amostra que mais aproximou-se estatisticamente dos padrões.

TABELA 16 – RESULTADO DE IC₅₀ E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH DE *S. westermanii*

| AMOSTRA | IC ₅₀ (µg/mL) ± DP | CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY* | | | | | |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----|----|----|----|----|
| VITAMINA C | 4,922 ± 0,066 | a1 | | | | | |
| RUTINA | 6,155 ± 0,077 | a1 | | | | | |
| EXTRATO BRUTO | 169,520 ± 3,503 | | | | | a5 | |
| FRAÇÃO HEXANO | 346,962 ± 1,827 | | | | | | a6 |
| FRAÇÃO CLOROFÓRMIO | 71,461 ± 0,212 | | | a3 | | | |
| FRAÇÃO ACETATO DE ETILA | 26,982 ± 0,769 | | a2 | | | | |
| FRAÇÃO REMANESCENTE | 146,724 ± 0,118 | | | | a4 | | |

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

FONTE: O autor (2014)

5.7.5.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS

No ensaio antioxidante pelo método TBARS, todas as frações e o extrato bruto apresentaram atividade antioxidante por esse método, mas apenas as frações hexano e remanescente apresentaram respostas próximas ao controle BHT, porém não possuíram atividades semelhantes a ele. O BHT foi utilizado como controle positivo, por ser um antioxidante sintético utilizado em alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os resultados da análise podem ser visualizados na Tabela 17.

TABELA 17 – RESULTADO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO TBARS

| AMOSTRA (1000 µg/mL) | IA (%) ± DP | CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT* | | |
|-------------------------|-----------------|--|----|----|
| | | a1 | a2 | a3 |
| BHT | 33,977 ± 6,114 | | | |
| EXTRATO BRUTO | 3,684 ± 7,804 | | | a3 |
| FRAÇÃO HEXANO | 23,041 ± 10,823 | | a2 | |
| FRAÇÃO CLOROFÓRMIO | 1,053 ± 8,513 | | | a3 |
| FRAÇÃO ACETATO DE ETILA | 4,854 ± 10,354 | | | a3 |
| FRAÇÃO REMANESCENTE | 15,497 ± 6,436 | | a2 | |

(*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

IA (%) – Índice Antioxidante: média de cinco repetições.

FONTE: O autor (2014)

Para uma melhor visualização comparativa dos resultados obtidos por esse método, os resultados estão expressos no Gráfico 16.

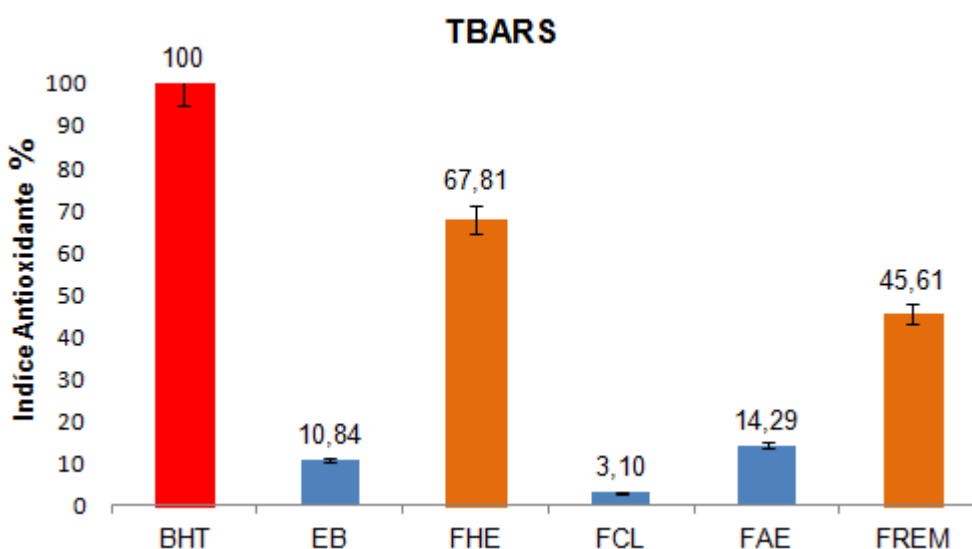


GRÁFICO 16 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *S. westermanii* PELO MÉTODO TBARS COMPARADO AO BHT

NOTA: (1) BHT (Butil Hidroxitolueno); EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FRE (Fração Remanescente)

(2) BARRAS COM A MESMA COR NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2014)

Segundo Zin, Abdul-Hamid e Osman (2002) danos causados aos sistemas biológicos por ação de radicais livres ocorrem após a indução do estresse oxidativo.

Para Freitas *et al.* (2005) a presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, participando diretamente de mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nesses processos.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a espécie *Senecio westermanii* Dusén nas condições dos experimentos utilizados, obteve as seguintes conclusões:

A espécie *S. westermanii*, pertencente à família Asteraceae, não apresenta descrição na literatura sobre sua composição fitoquímica ou qualquer outro estudo descritivo. Em uma pesquisa fitoquímica preliminar, esta espécie evidenciou a presença de grupos fitoquímicos como: alcaloides, flavonoides, iridoides, esteroides e/ou triterpenos e heterosídeos saponínicos. Foram isolados cristais da fração hexano que foram identificados como uma mistura de três componentes: β -sitosterol, estigmasterol e campesterol.

Foi realizado o teste de toxicidade frente à *Artemia salina*, o extrato bruto e frações apresentaram um valor de DL_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa, mostrando dessa forma a ausência de toxicidade da espécie contra os náupilos. Principalmente, quando comparada ao controle positivo, sulfato de quinidina, que teve uma DL_{50} de 89,41 $\mu\text{g/mL}$.

No ensaio de atividade hemolítica nenhuma das amostras foram estatisticamente semelhantes ao controle, porém, quando as amostras são comparadas em relação ao controle, observa-se que a fração hexano nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram valores de hemólise de 80,55 e 40,30%, respectivamente.

Foi testada a atividade antibacteriana para a espécie *S. westermanii* utilizando os microrganismos *S. Aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *K. pneumoniae*, porém a espécie apresentou-se com fraca atividade ou inativa contra os microrganismos escolhidos.

O ensaio de atividade alelopática revelou influência negativa das frações hexano e clorofórmio nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ contra as sementes de *Lactuca sativa*. No ensaio de crescimento da radícula e hipocótilo todas as frações e o extrato bruto influenciaram negativamente no desenvolvimento das plântulas; na respiração celular apenas a fração remanescente nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi estatisticamente semelhante ao controle água, enquanto

todas as outras amostras influenciaram de forma negativa a respiração das plântulas. Para o ensaio de fotossíntese observou que todas as frações foram estatisticamente semelhantes ao controle, dessa forma não alterando o processo de fotossíntese da espécie *Lacuca sativa*.

Na atividade antioxidante, no ensaio do complexo fosfomolibdênio, observa-se que a fração clorofórmica possui atividade estatisticamente semelhante a do controle rutina. E quando comparada em relação aos controles, rutina e vitamina C, essa fração apresentou um resultado de 92,51 e 33,08%, respectivamente. No ensaio do radical DPPH nenhuma das frações foi estatisticamente semelhante aos controles, porém a fração que mais aproximou-se foi a acetato de etila, com um valor de IC_{50} 26,98 μ g. Para o teste do TBARS apenas a fração hexano conseguiu uma atividade antioxidante superior a 50%, atingindo um valor de 67,81% em relação ao controle BHT.

Os estudos com a espécie *S. westermanii* são inéditos, pois não foram encontrados estudos de atividades biológicas e, também, na área botânica. Esta espécie é promissora para estudos futuros, para aprofundar e comprovar que suas ações biológicas são importantes para a saúde da população que dela fizer uso. A ausência de toxicidade *in vitro*, excelentes resultados da ação antioxidante e possuir atividade alelopática contra outra espécie de planta faz das frações e do extrato bruto um excelente alvo de estudo *in vivo* para esta espécie.

REFERÊNCIAS

ABDO, S. *et al.* Furanoeremophilanes and other constituents from *Senecio canescens*. **Phytochemistry**, v.31, n.11, p.3937-3941, 1992.

ABIFISA - **Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde**. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br/default.asp>>. Acesso em: 29/06/2012.

AHMED, M.; WARDLE, D. A. Allelopathic potential of vegetative and flowering ragwort (*Senecio jacobaea* L.) plants against associated pasture species. **Plant and Soil**, 164:61:68. Netherlands, 1994.

ALMEIDA, F. S. **Alelopatia e as plantas**. Circular , 53. Londrina: IAPAR. 68 p. 1988.

ANAYA, A. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.; TORRES-BARRAGÁN, A.; LÉON-CANTERO, R.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M. Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decopositum* (A. Gray) H. Rob. E Brettell (Asteraceae), matricaria or maturing. **Journal of Chemistry of Ecology**, 22:393-403, 1996.

ANDERBERG, A. A. *et al.* **Compositae**. The Families and Genera of Vascular Plants, **Flowering Plants**. Eudicots. Asterales. Vol. 8p. 61-588. Springer, Berlin, 2007.

ANDRADE, M. R. de. Alcalóides de Rutaceae: química e atividade biológica. Tese de Doutorado. UFSCar. São Carlos, 2003.

ARCTOS - **Multi-Institution, Multi-Collection and Museum Database**. Disponível em:[http://arctos.database.museum/TaxonomyResults.cfm?full_taxon_name=Senecio +westermanii](http://arctos.database.museum/TaxonomyResults.cfm?full_taxon_name=Senecio+westermanii). Acessado em: 18/06/2014.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, 1949.

AYRES, M. C. C. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.90-97, 2008.

BANERJEE, A.; KUNWAR A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**. Santa Fe, v. 172. n. 2. p. 134-139, jul. 2008.

BARATTO, L.; LANG, K. L.; VANZ, D. C.; REGINATTO, F. H.; OLIVEIRA, J. B.; FALKENBERG, M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18(4): 577-582, Out./Dez. 2008.

BARNES, J.P.; PUTNAN, A.R.; BURKE, B.A.; AASEN, A.J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. *Phytochemistry*, v. 26 n. 5, p.1385-1390, 1987

BARREDA, V. D. *et al.* Eocene Patagonia Fossils of the Daisy Family. **Science**. Vol. 329. Sept, 2010.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 3. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.

BELINELO, V. J.; CZEPAK, M. P.; FILHO, S. A. V.; MENEZES, L. F de; JAMAL, C. M. Alelopatia de *Arctium minus* BERNH (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). **Revista Caatinga**. Caatinga (Mossoró, Brasil), v.21, n.4, p.12-16, outubro/dezembro de 2008.

BOHLMANN, F. *et al.* New furanoeremophilanes from South African *Senecio* species. **Phytochemistry** 16 (965), 1977.

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J. Sesquiterpenes from three *Senecio* species. **Phytochemistry**, v.20, n.3, p.469-472. 1981

BOLZAN, A. A.; SILVA, C. M.; FRANCESCATO, L. N.; MURARI, A. L.; SILVA, G. N. S; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. Espécies de *Senecio* na medicina popular da América Latina e toxicidade relacionada a sua utilização. **Latin American Journal of Pharmacy**, 26 (4), 619-625, 2007.

BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Influência alelopática de *Phytolacca díóica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 67-75, 2009.

BORGES, R. A. X. *et al.* 2012. **Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000055>>. Acessado em: 18/06/2012.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904p., 2v/il.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a Análise de Sementes**. 399 p. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BREMER, K. **Asteraceae – cladistics and classification**. Timber press, Portland, 1994.

CABRERA, A. L.; KLEIN, R.M. Compostas. In: REITZ, P.R. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p.136, 190-192. 1975.

CARMINATE, B.; BARCELOS, R. M.; LACERDA, C. D.; MARTIN, G. B.; BELINELO, V. J.; ALMEIDA, M. S. Potencial fitotóxico de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) na germinação de sementes. **X Congresso de Ecologia do Brasil**. São Lourenço – MG, 16 a 22 de Setembro de 2011.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

CASTRO, V; ROMO, M.; VILLAGRÁN, C. Etnobotánica del sur de los andes de la primera región de Chile: um enlace entre las culturas altiplánicas y las de quebradas altas del lo superior. Chungara: **Revista Antropologia Chilena**, vol. 35, n. 1, pp.73-124. Chile, 2003.

CATAÑEDA, P.; MATA, R.; LOTINA-HENNSSEN, B.; ANAYA, A. L.; BYE, R. Phyto-growth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. **Journal Natural Products**, 59:232-326, 1996.

CAVALCANTE, M.F. *et al.* Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p.20-22, 2000.

CHUNG, I. M.; AHN, L. K.; YUN, S. J. Assesment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, p. 921-928, 2001.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Eight edition. M7-A8, 2009.

COIMBRA R. “**Notas de Fitoterapia**: Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia” (E.D. da Silva, rev.), L.C.S.A. 2 ed., pág. 349. Rio de Janeiro, 1958.

CRUZ-SILVA, C. T. A. da; SATORUM, M.; BINI, F. V. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas. **Cultivando o Saber**. Cascavel, v.2, n.1, p.62-70, 2009.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: **A biosynthetic aproroach**. John Wiley & Sons LTD, 2º ed., p.291-300. England, 2002.

DUPRÉ, S. *et al.* Eremophilane, germacrane and shikimic acid derivatives from chilean *Senecio* species. **Phytochemistry**, v.30, n.4, p.1211-1220, 1991.

ECONOMOU, G.; TZAKOU, O.; GANI, A.; YANNITSAROS, A.; BILALIS, D. Allelopathic effect of *Conyza albida* on *Avena sativa* and *Spirodela polyrhiza*. **Journal Agronomy & Crop Science**. p.248-253, 2002.

FERNÁNDEZ, L. F. HAMMOND, G.B.; VAISBERG, A. J.; VILLEGAS, I. D. A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas. **J. Ethnopharmacol.** 61, p.17-30.1998.

FERREIRA, A. G., AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 12, p. 175-204, 2000.

FORTIN, H. *et al.* In vitroantiviral activity of thirty-six plants from La Réunion Island. **Fitoterapia**, v.73, n.4, p.346-350, 2002

FRANCESCATO, L. N. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* DC. (*Asteraceae*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007.

FREITAS, R. M.; SOUZA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **FEBS J.**;272:1307-12, 2005.

FUNKE, I.; MELZIG, M. F. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.1, p.1-5. 2006.

GARCÍA, V. M. N. *et al.* Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.87, n.1, p.85-88, 2003.

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004.

GAZIRI, L. R. B.; CARVALHO, R. I. N. de. Efeito alelopático de carqueja, confrei e mil-folhas sobre o desenvolvimento da tiririca. **Rev. Acad.**, Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba, v. 7, n. 1, p. 33-40, jan./mar. 2009.

GOUVEA, D. R. **Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão (*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae)**. Ribeirão Preto, 2010.

GUSMAN, G. S.; BITTENCOURT, A. H.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). **Evidência**, Joaçaba v. 9 n. 1-2, p. 53-66, janeiro/dezembro, 2009.

HABERMEHL, G. G.; MARTZ, W.; TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; MENDEZ, M. C. **Toxicon**, 26, 275, 1988.

HARIPRASATH, L.; JEGADEESH, R.; RAAMAN, N. Gastroprotective effect of *Senecio candicans* DC on experimental ulcer models. **Centre for Advanced Studies in Botany**. University of Madras, Guindy Campus, Chennai 600 025. India, 2012.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos pp. 765-791. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003.

HEYWOOD, V. H.; **Flowering plants of the world**. Oxford University. Press: New York, 1993.

HOFFMANN, C. E. F.; NEVES, L. A. S.; BASTOS, C. F.; WALLAU, G. L. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 6, n. 1, p. 11-21, 2007.

HOLETZ, F. B., *et al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química-IV, São Carlos, SP, EdUFSCar, 2003, 152 p.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 7.ed. São Paulo: Nacional. 1985.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 10.ed. São Paulo: Nacional. 1991.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. *Sensors and Actuators B*, v.88, p.101-105, 2003.

KOSEKI, P. M. *et al.* Effects of irradiation in medicinal and eatable herbs. **Radiation Physical Chemistry**, v. 63, p. 681-684, 2002.

KISHIDA, E. *et al.*; Re-evaluation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances as indices of autoxidation based on the oxygen consumption. **J. Agric. Food Chem.** 41:1–4. 1993.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE, M.; TSAY, H. S.; SUBBARAJU, G. V. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. **International Journal of Applied Science and Engineering**, Taiwan, v. 3, n. 2, p. 125-34, 2005.

LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, p. 170, 1983.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes. In: S.P. Colowick & N.O. Kaplan (eds.). *Methods in enzymology*. v. 148, pp. 350-382. **Academic Press**, New York, 1987.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Efeito dos extratos de duas plantas medicinais do gênero *Bidens* sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 32(1):83-87, 2011.

LIU, F.; NG, T.B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. **Life Sci.**, v.66, n.8, p.725-735, 2000.

LOIZZO, M. R. *et al.* **Bioactive extracts from *Senecio samnitum* Huet.** *Nat. Prod. Res.*, v.20, n.3, p.265-269, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **“Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas”**, Instituto Plantarum, pag. 161. Nova Odessa - SP, 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática** – guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Instituto Plantarum. Nova Odessa, 2008.

MACEL, M. *et al.* Diversity of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species does not affect the specialist herbivore *Tyria jacobaeae*. **Institute of Evolutionary and Ecological Sciences**. Leiden University, P.O. Box 9516, 2300 RA Leiden, *Oecologia* 133:541–550. The Netherlands, 2002.

MACIAS, F.A.; CASTELLANO, D. & MOLINILLO, J.M.G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MAGIERO, E. C. **Fisiologia da floração e atividade alelopática de *Artemisia annua* L. cultivar *Artemis* cultivada em clima subtropical úmido**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, 2009.

MANSOUR, R. H. A.; SALEH, N. A. M. **Flavonoids of three local *Senecio* species**. National Research Centre, El-Dokki. Cairo, Egypt, 1980.

MANSOUR, R. H. A.; SALEH, N. A. M. **Phytochemistry** 20 (1180), 1981.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006.

MATILDA, A. K.; ROSSI, M. E.; BLUMENTHAI, E. E. A.; SCHUQUEL, J. T. A.; MALHEIROS A.; VIDOTT, G. S. Glucopyranosylsitosterol in species of Labiatae, Verbenaceae and Apocynaceae. **Anais Assoc Bras Quim**, 43: 147-151, 1996.

MATOS, P. F. de. **Estudo etnobotânico de *Bidens pilosa* (L.) “picão-preto” (Asteraceae) junto à Pastoral da Saúde do município de Criciúma-SC: a fonte do saber e a valorização do conhecimento popular**. Projeto de trabalho de conclusão de curso, apresentado para o curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC. Criciúma, 2009.

MATZENBACHER, N. I. **“O Complexo “Senecionoide” (Asteraceae - Senecionae) no Rio Grande do Sul Brasil”**. Programa de Pós-Graduação em Botânica, UFRGS, Tese. Porto Alegre, 1998.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Biossays for Active Plant Constituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.

MEZACHE, N. **Fast counter current chromatography of n-butanolic fraction from *Senecio giganteus* (Asteraceae)**. Université Mentouri, Constantine, laboratoire de Phytochimie et d'Analyses Physico-chimiques et Biologiques, département de Chimie, Faculté des Sciences exactes, Algérie. Oct, 2009.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR**. Curitiba, 2003.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U, P; ARAÚJO, E. L; AMORIM, E. L. C de. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p.892-896, 2005.

MORAIS, S. M. de M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n.5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.

OLIVEIRA, L. G. A.; BELINELO, V. J.; ALMEIDA, M. S. de; AGUILA, E. B. de; FILHO, S. A. V. Alelopatia de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) na germinação e crescimento inicial de sorgo, pepino e picão preto. **Enciclopédia Biosfera**. Vol.7, n.12. Centro Científico Conhecer - Goiânia, 2011.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E. de; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PELSER, P. B. *et al.* Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of *Senecio* section Jacobaea (Asteraceae). **Phytochemistry** 66, p.1285–1295. January, 2005.

PÉREZ, C.; AGNESE, A. M.; CABRERA, J. L. **The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): chemical composition and antimicrobial activity tests.** J. Ethnopharmacol., v.66, n.1, p.91-96, 1999.

PERIOTTO, F.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasílica**, v. 18, n. 3, p. 425-430, 2004.

PICCININI, F.; REIMCHE, G.; RECK, L.; CORADINI, C., MACHADO, S. L. O. POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Conyza bonariensis* NA GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* L. **XVIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**. Biologia das plantas daninhas. Campo Grande, MS. Biologia das plantas daninhas, 2012.

PIRES, N. M. *et al.* Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Science: Agriculture**, v.58, n.1, p.61-65, Jan./Mar. 2001.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

QASE, M. Jr.; HIL, T. Possible role of allelopathy in the competition between tomato, *Senecio vulgaris* L. and *Chenopodium album* L. *Weed Research*, vol. 29, n. 5. Oct, 1989.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic, 422 p. 1984.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v.23, p.127-149, 1988.

RIZVI, S.J.H. & RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall, p.443-472, 1992.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

ROBINSON, H. Generic and Subtribal Classification of American *Vernonieae*. **Smithsonian Contributions to Botany**. n.89, p.116, 1999.

RODRIGUES, B. N.; PASSINI, T.; FERREIRA, A. G. Research on allelopathy in Brazil. In: NARWAL, S. S. (Ed.). **Allelopathy update**. New Hampshire: Science Publishers, 1999.

ROEDER, E.; WIEDENFELD, H.; PFITZER, A. Doriasenine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio doria*. **Phytochemistry**, vol.27.Nº.12, pp.4 000 – 4001. Great Britain, 1988.

SANTOS, A. O. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, Mai 2008.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora salicifolia* Mart. (*Vernonieae*, *Asteraceae*)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Unicamp. Campinas, 1991.

SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, p.10-17. Rio de Janeiro - RJ, 1999.

SILVA, V. S. da. **Potencial alelopático do óleo essencial de espécies de *Heterothalamus* Less. (Asteraceae) nativas no Rio Grande do Sul.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, 2012.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: 6ªEd. UFRGS, 2007, p. 230, 237.

SIQUEIRA, J. M. *et al.* Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a Artemia salina Leach. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SONAGLIO, D. *et al.* Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, p.1423-26, 1967.

TANAKA, J. C. A. S. *et al.* Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 834-837, Jul 2005.

TELES, A. M. **Senecio in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB116382>>. Acessado em: 18/06/2012.

TELES, A. M. **Senecio in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB016295>>. Acessado em: 25/06/2012.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Uso Plantas Medicinais. **Revista Arquivos FOG – Saúde Sociedade e Meio Ambiente**, vol. 5 (1): 33-41, 2008.

VILLARROEL, L. V.; TORRES, R. G.; URZÚA, A.; MODAK, B.; HENRIQUEZ, J.; SALGADO, I. Rev. **Latinamer. Quim.**, 25, 109, 1997

VISBISKI, V. N.; WEIRICH, P. H.; SANTOS, A. L. **Uso popular das plantas medicinais no assentamento Guanabara**, Imbau – PR. UEPG - Ciências Exatas Terra, v.9, p.13-20. Ponta Grossa, 2003.

YAMAUTI, M. S.; BARROSO, A. A.M.B.; ALVES, P.L.C.A. Potencial alelopático de buva (*Conyza* sp.). In: **Anais...** XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, Ribeirão Preto – SP, 2010.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal moderna**: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente. Chapecó: Argos, 2001.

ZDERO, C. *et al.* Co-occurrence of pyrrolizidine alkaloids and acylpyrrols in *Senecio magnificus* and constituents of other Australian *senecio* species. **Phytochemistry**, vol. 29, No.2, pp. 509-511. Great Britain, 1990.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chem.** 78:227-31, 2002.

ZUCCHI, M. I. Diversidade genética em espécies medicinais. Disponível em: < <http://www.infobibos.com/Artigos/2009> >. Acesso em: 05/07/2012.